



TITLE:

葉菜類における組織・細胞培養を利用したゲノム制御とその耐病性
育種への応用に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

松本, 悦夫

CITATION:

松本, 悦夫. 葉菜類における組織・細胞培養を利用したゲノム制御とその耐病性育種への応用に関する研究. 京都大学, 1999, 博士(農学)

ISSUE DATE:

1999-11-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3161744>

RIGHT:

葉菜類における組織・細胞培養を利用したゲノム制御と
その耐病性育種への応用に関する研究

松本悦夫

目 次

緒言	1
第1章 <i>Brassica</i> 属野菜における半数体の育成	3
第1節 薬培養による胚様体の誘導と植物体再生	3
1 花粉の発育ステージ	3
2 培地	5
3 培養環境	18
第2節 再生個体の染色体数および一般特性	20
第2章 ハクサイの耐病性倍加半数体系統の育成	26
第1節 薬培養による倍加半数体の作出	26
第2節 倍加半数体の耐病性検定	28
第3節 根こぶ病抵抗性の遺伝	34
第3章 倍加半数体系統を利用したハクサイの遺伝子連鎖地図の作成	39
第1節 実用形質の遺伝	39
第2節 RFLP マーカーの検索	42
第3節 遺伝子連鎖地図の作成	46
第4章 レタスにおける種間体細胞雑種の育成	55
第1節 プロトプラストからの植物体再生	55
1 プロトプラストの作成	55
2 プロトプラストの培養	59
第2節 細胞融合による体細胞雑種の作出	74
1 プロトプラストの融合	74
2 雑種細胞の選抜	78
3 雑種細胞からの植物体再生	82
第5章 レタスの体細胞雑種の一般特性、耐病性および染色体構成	87
第1節 形態的特性および稔性	87
第2節 腐敗性病害抵抗性	97
第3節 染色体構成	101
第6章 レタスの体細胞雑種のアイソザイムおよび遺伝子分析	114
第1節 アイソザイム分析	114
第2節 遺伝子分析	117
総合考察	131
摘要	136
引用文献	140
付録	154

緒 言

植物の組織培養に関する研究は 20 世紀初頭に端を発し、以来 1 世紀にわたる歴史の中で著しい進歩・発展を遂げた。初期の研究においては細胞の生育を *in vitro* で制御するための実験系の確立に力が注がれ、その後、確立された実験系を用いて分化・発生機構の究明へと研究は進展した。さらに、蓄積された多くの研究成果は生理、生化学および遺伝学等の基礎的領域から農業や工業などの応用的領域まで幅広い分野で活用され、植物の組織・細胞培養は新たな研究分野への展開を伴いながら進化し、現在に至っている。

農業における組織培養の利用は茎頂培養によるダリアのウイルスフリー化 (Morel & Martin, 1952) およびランの増殖 (Morel, 1965) に始まる。以後、種々の植物で組織培養を用いた無病化および大量増殖技術の開発が進められ、栄養繁殖性園芸作物を中心に苗生産の一手段としてこれら技術の実用化が図られた。一方、研究の進展に伴い、組織・細胞培養の応用範囲は育種分野へと拡大し、*in vitro* での遺伝的変異の制御を目途に確立された様々な育種関連培養技術は、従来の交雑育種では困難なゲノムおよび遺伝子レベルでの変異創出を可能とするなど、育種の新たな展開を導いた。

組織・細胞培養の育種的利用の中でゲノムレベルでの遺伝的制御を可能とする手法に葯・花粉培養と細胞融合技術がある。前者はゲノム削除による変異収束を、後者はゲノム添加による変異拡大を目的に用いられる技術で、それぞれ有用遺伝子型個体の創出に、より積極的な方向づけを与える手法として育種への適用がはかられる。培養対象が、葯・花粉培養では雄性生殖細胞、細胞融合では体細胞という違いはあるが、ともに細胞の分化全能性 (totipotency) に技術的根拠を置き、単細胞から個体再生を導くことでゲノム制御を図る点で通ずるものがあり、細胞レベルでの遺伝事象を個体レベルに反映させる普遍性のある技術として植物全般に適用され得る。

葯・花粉培養に関しては、Guha & Maheshwari (1964) がチョウセンアサガオ (*Datura innoxia*) の葯培養で花粉起源の半数性植物体を作出して以来、数多くの植物種で半数体作出のための培養条件の検討が行われ、1960 年代後半にナス科やイネ科作物で効率的な培養方法が確立されるに及びその育種的利用は急速に進んだ。半数体の育種的意義は、その染色体倍加により遺伝的に固定した 2 倍体を得られること、遺伝子型が表現型に直接反映されるため優性、劣性を問わず形質の評価が確実に行えることにある。葯・花粉培養を用いての半数体の安定的作出は、純系育成年限の短縮および目標形質の選抜効率の向上を通して、育種の効率化に大きく寄与するものと期待され、その有効性は穀類や野菜類の育種の中で検証されている。

一方、細胞融合技術は有性生殖の壁を打ち破る手法として開発され、動植物の体細胞遺伝学研究に新たな道を開いたが、植物育種の分野においては Carlson ら (1972) による *Nicotiana* 属での種間体細胞雑種個体の作出を端緒に、応用的観点から多面的なアプローチが図られた。これまでに主として交雑が困難な植物種間で融合方法や融合細胞からの個体再生に至る培養条件についての検討が行われ、異種、異属間の多様な組合せで体細胞雑種が育成されている。

細胞融合によれば、核ゲノムのみならず、細胞質内のミトコンドリアおよび葉緑体についても交雑育種では不可能なゲノム組合せが実現し、それぞれのゲノムに存在する遺伝子間の組換えも期待できる。また、片側ゲノムの一部不活化による非対称融合法を用いれば、特定の染色体部分の導入も可能になる。細胞融合は新たなゲノム構成植物の創出に有効であるだけでなく、耐病性、耐虫性、除草剤耐性、細胞質雄性不稔性などの有用形質を異種から導入するための手段としても重要な位置づけがなされる。

本研究は葉菜類を対象に、組織・細胞培養を利用したゲノム制御とその耐病性育種への応用について検討したもので、内容はアブラナ科 *Brassica* 属野菜における薬培養による半数体の作出と利用およびレタス (*Lactuca sativa*) における細胞融合による野生種との種間体細胞雑種の育成に分かれる。ハクサイおよびキャベツ等の *Brassica* 野菜の薬培養に関しては、効率的に半数体を作成するための培養条件の究明を行い、育成した倍加半数体について耐病性育種での利用を検討した。また、レタスにおいては腐敗性病害抵抗性野生種 *L. virosa* との細胞融合条件を検討し、作出した体細胞雑種について形態的特性および耐病性を調査するとともに、染色体および遺伝子分析を行い、そのゲノム構成を探った。

その結果、*Brassica* 属野菜では効率的な花粉からの胚様体作出条件が明らかとなり、実用的育種の中での半数体の利用が可能となった。また、レタスでは作出した体細胞雑種が耐病性を有することが確認され、そのゲノム構成に関してもいくつかの知見が得られた。

本論文をまとめるにあたり、懇篤なご指導を賜り、校閲の労をとられた京都大学教授池橋宏博士に謹んで深謝の意を表する。また、本研究を行うにあたり、ご助言をいただきかつ多大の便宜を図っていただいた長野県野菜花き試験場野菜部長塚田元尚氏、元同試験場長大谷英夫氏および元長野県中信農業試験場長藤森基弘氏に心より感謝する。さらに、実験の遂行にあたり、協力をいただいた長野県営農技術センター塩川正則氏、信州大学助教授大井美知男博士および北陸農業試験場近江戸伸子博士に対して厚くお礼申し上げる。また、実験の遂行に際し、技術的援助をいただいた山西和枝氏に深く感謝する。その他、長野県野菜花き試験場育種部の諸兄には多大の協力をいただいた。ここに記して感謝の意を表する。

第1章 *Brassica*属野菜における半数体の育成

1960年代前半に始まる薬培養研究は、結果として生ずる半数性ゲノム個体の遺伝・育種的安全性から植物育種での応用へと直ちに波及した。様々な植物種で半数体作出条件の検討がなされる中で、アブラナ科植物においては1970年代に入り花粉から胚様体を導く安定した培養系の確立がなされた。

薬培養における花粉（小孢子）からの半数体作出経路には、カルス経由と胚様体経由の2通りあり、植物体再生効率と再生までの所要日数および培養変異の発生などを考慮すると、胚様体誘導による経路が望ましいとされる（中島, 1979）。*Brassica*植物の薬培養ではまずAゲノムの*Brassica campestris*（Kellerら, 1975）およびACゲノムの*B. napus*（Thomas & Wenzel, 1975）で胚様体の作出が報告され、その後Cゲノムの*B. oleracea*（Keller & Armstrong, 1983）においても胚様体経由により半数性植物体の育成が図られた。さらに*B. hirta*（Klimaszewska & Keller, 1983）および*B. juncea*（Sharma & Bhojwani, 1985）でも半数体作出され、薬培養はアブラナ科全般に適用可能な汎用性のある技術となった。

以上のような薬培養研究の進展を背景に、*Brassica*作物での半数体の育種利用は実用化の段階を迎え、野菜類においても耐病性の付与および品質向上などを目標に、半数体育種への取り組みが近年活発に行われている。

本章では*Brassica*属野菜における花粉起源半数体の効率的な作出を目的に、ハクサイ（*B. campestris* var. *pekinensis*）、チンゲンサイ（*B. campestris* var. *chinensis*）およびキャベツ（*B. oleracea* var. *capitata*）を対象として、その薬培養に関する諸要因の影響についての検討を行った。また、ハクサイの薬培養で得られた胚様体からの再生個体について、染色体数および形態等の特性を調査した。

第1節 薬培養による胚様体の誘導と植物体再生

1 花粉の発育ステージ

材料および方法

ガラス温室内に定植した長野県野菜花き試験場（以下野菜花き試験場）育成のハクサイ系統C15-3（根こぶ病抵抗性カブ‘Gelria R’と千歳系ハクサイとの交雑後代BC₃S₂）とキャベツ系統(BFCR×EFPR)-87（根こぶ病抵抗性、萎黄病抵抗性固定系統間のF₁）株の伸長した花茎から、大きさの異なる蕾を採取した。蕾は大きさ別にクリーンベンチ内で70%のエタノールに数秒間浸漬した後、9%さらし粉（次亜塩素酸カルシウム）液中で7分間殺菌し、3回滅菌水ですすいだ。実体顕微鏡下で蕾を開き、薬を花糸から切り離して直径2 cmの平底管びん内の改変B5固形培地（Kellerら, 1975；Keller & Armstrong, 1977）に置

床した。1 試験管当たりの葯数は12とし、置床葯は暗黒下 35℃で1 日培養した後 25℃（暗黒）に移した。

結果

蕾の大きさと花粉発育ステージの関係は出蕾時期および供与植物体の齢により異なった。ハクサイでは長径 1.5～2 mm の蕾の花弁長／葯長は概ね 1/4～1/2 で花粉発育ステージの 1 核前～中期に、また 2～4 mm の蕾は 1/2～1 で 1 核後期～2 核期に相当した。キャベツでは蕾長 2～3 mm の花弁長／葯長が 1/4～1/2、3～5 mm が 1/2～1 で、花粉発育ステージと花弁長／葯長の関係はハクサイと同様であった。表 1 に示すようにハクサイおよびキャベツともに花弁長／葯長が 1/4～1/2 の若い葯から胚様体の発生が認められ、置床葯に対する胚様体形成葯の割合（胚様体形成率）はハクサイで 1.0%、キャベツで 0.7%であった。花弁長／葯長が 1/2～1 の葯についてはキャベツでは胚様体の形成がみられず、ハクサイでも 0.4%の低形成率であった。

表 1 胚様体形成に及ぼす花粉発育ステージの影響

種 類	花弁長／葯長	置 床	胚 様 体	胚 様 体	胚様体数
系 統	(発育ステージ)	葯 数	形成葯数	形成率 %	
ハクサイ	1/4-1/2(1 核前-中期)	290	3	1.0	4
C15-3	1/2-1(1 核後-2 核期)	265	1	0.4	1
キャベツ	1/4-1/2(1 核前-中期)	412	3	0.7	6
(BFCR×EFPR)-87	1/2-1(1 核後-2 核期)	292	0	0	0

考察

葯培養における花粉からの胚形成は特定の発育ステージの時にのみ誘起されることが知られ、多くの植物種では 1 核期が胚様体誘導に適するとされる。*Brassica* 属においても 1 核期小孢子ステージの葯の使用が胚様体形成に有効であるとの報告（Thomas & Wenzel, 1975； Keller ら, 1983）がなされ、本実験でも既報を裏づける結果が得られた。1 核期の葯で胚形成率が高い理由は明らかでないが、単離花粉の培養でやや遅い有糸分裂前後のステージの小孢子が高胚形成能を有する（Polsoni ら, 1988； Takahata ら, 1991）ことから類推すると、葯培養においては培地成分が葯壁を介して葯組織内部へ供給されるため、時間差をおいて作用が及ぶ培地成分の効果と葯の発育に伴って葯壁から分泌される物質の効果が 1 核期小孢子的発育ステージの進行と絡み合って、胚分化が生じるとの見方もできる。

花粉発育ステージを逐次核染色により判別にすることは煩雑であり、多くの場合蕾の大

きさを指標に推定する簡便な方法がとられる (Lichter, 1981; Loh & Ingram, 1982; Polsoni ら, 1988; Sato ら, 1989; Phippen & Ockendon, 1990)。しかし、蕾の大きさと花粉ステージとの関係は供試材料や育成条件によっても微妙に変化することから、ここでは簡易判別法として花卉長と葯長の比から推定する方法 (Keller ら, 1975, 1983) を用いた。この方法は *Brassica* 属の広範な種に適用可能とされ (Keller ら, 1983)、本実験でも概ね 1/4~1/2 が 1 核前~中期に、また 1/2~1 が 1 核後期~2 核期に相当するなど既報とほぼ一致した結果を得た。従って、以下の実験では花卉長/葯長を指標に 1 核期の花粉発育ステージの葯を使用した。

2 培地

(1) 基本培地

材料および方法

培地検討の材料として野菜花き試験場育成のハクサイ C15-3 系統株を供試した。前項と同様に花茎より採取した蕾を殺菌し、すすぎを行った後、葯を摘出して培地に置床した。基本培地として LS、B5 (Gamborg ら, 1968) 改変および Nitsch (Nitsch & Nitsch, 1969) の 3 培地を用いた。いずれの培地もショ糖濃度は 10% とし、2,4-D (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) と NAA (ナフタレン酢酸) をそれぞれ 1 および 2 mg/l の濃度で組合せて添加した。培養温度等培養条件は前項に準じた。さらに改変 B5 培地についてはハクサイ M46-7 (根こぶ病抵抗性カブ 'Gelria R' と松島系ハクサイとの交雑後代 BC₃S₂) 系統を用いて無機塩類濃度の、またチンゲンサイ PA43-74 系統 (中国より導入のチンゲンサイ固定系統とハクサイ根こぶ病抵抗性系統との交雑後代 BC₃S₁) およびキャベツ品種 'SE' を用いて無機成分中のアンモニウムイオン濃度の影響を検討した。培養温度条件は前項と同様とし、暗黒下で培養した葯は 3 週間後に 1000lx・14h 照明下に移した。また、形成された胚様体はショ糖濃度 2% の LS 培地 (Linsmaier & Skoog, 1965) に移植し、25°C、2000lx・14h 照明下で培養して発育を促した。発育した幼植物の一部についてはパーミキュライトに植え出して 2 週間順化した後、ポリポットあるいは素焼き鉢に鉢上げした。

結果

3 基本培地の中で胚様体形成の認められたのは改変 B5 培地のみであった。胚様体形成率は 2,4-D、NAA を 2 mg/l 添加した培地が 1.6% で、1 mg/l 添加培地の 0.5% に優った (表 2)。LS および Nitsch 培地では葯壁からのカルス形成はみられたが、葯内部からの胚様体の発生は認められなかった。改変 B5 培地の無機塩類濃度については、標準濃度が 2.0% の胚様体形成率を示したのに対して 1/2 濃度では 0.2% と低下し、形成胚様体数も 40 に対して 1 と

著しく少なかった（表3）。アンモニウムイオンの影響について、チンゲンサイでは低濃度で胚様体形成が抑えられる傾向が認められ、標準濃度と 1/2 濃度での胚様体形成率は 2.7%と同率であったが、胚様体数では前者が優った（表4）。キャベツでは4倍濃度で高い胚様体形成率を示した（表5）。

胚様体は葯置床3～4週間後に裂開した葯壁内から発生した（図1-A；図2-A）が、その発育段階は球状から子葉が肥大したものまでと様々であった。また花糸を切り離した部位や他の体細胞組織からカルス化する葯も認められた。置床1カ月後に胚様体を葯から取り出し、低ショ糖濃度培地に移すことにより一部が幼植物体へと発育した（図1-B、C；図2-B）。鉢上げた幼植物はいずれも活着し、成苗となった（図1-D；図2-C）。

表2 胚様体形成に及ぼす基本培地の影響（ハクサイ C15-3 系統）

基本培地	生長調節物質 mg/l		置 床 葯 数	胚 様 体 形成葯数	胚 様 体 形成率 %	胚様体数
	2,4-D	NAA				
LS	1.0	1.0	183	0	0	0
	2.0	2.0	180	0	0	0
改変 B5	1.0	1.0	182	1	0.5	1
	2.0	2.0	182	3	1.6	6
Nitsch	1.0	1.0	181	0	0	0
	2.0	2.0	190	0	0	0

表3 胚様体形成に及ぼす改変 B5 培地無機塩類濃度の影響（ハクサイ M46-7 系統）

無機塩類濃度*	置 床 葯 数	胚 様 体 形成葯数	胚 様 体 形成率 %	胚様体数
× 1	447	9	2.0	40
×1/2	430	1	0.2	1

* 標準濃度を×1とする

表 4 胚様体形成に及ぼす NH_4^+ 濃度の影響 (チンゲンサイ Pa43-74 系統)

NH_4^+ 濃度*	置 床 薬 数	胚 様 体 形成薬数	胚 様 体 形成率 %	胚様体数
0	198	3	1.5	5
×1/4	185	3	1.6	5
×1/2	187	5	2.7	12
× 1	183	5	2.7	31

*標準濃度 (2mM) を×1 とする

表 5 胚様体形成に及ぼす NH_4^+ 濃度の影響 (キャベツ品種 'SE')

NH_4^+ 濃度*	置 床 薬 数	胚 様 体 形成薬数	胚 様 体 形成率 %	胚様体数
0	152	1	0.7	1
× 1	178	1	0.6	1
× 4	176	7	4.0	8

*標準濃度 (2mM) を×1 とする

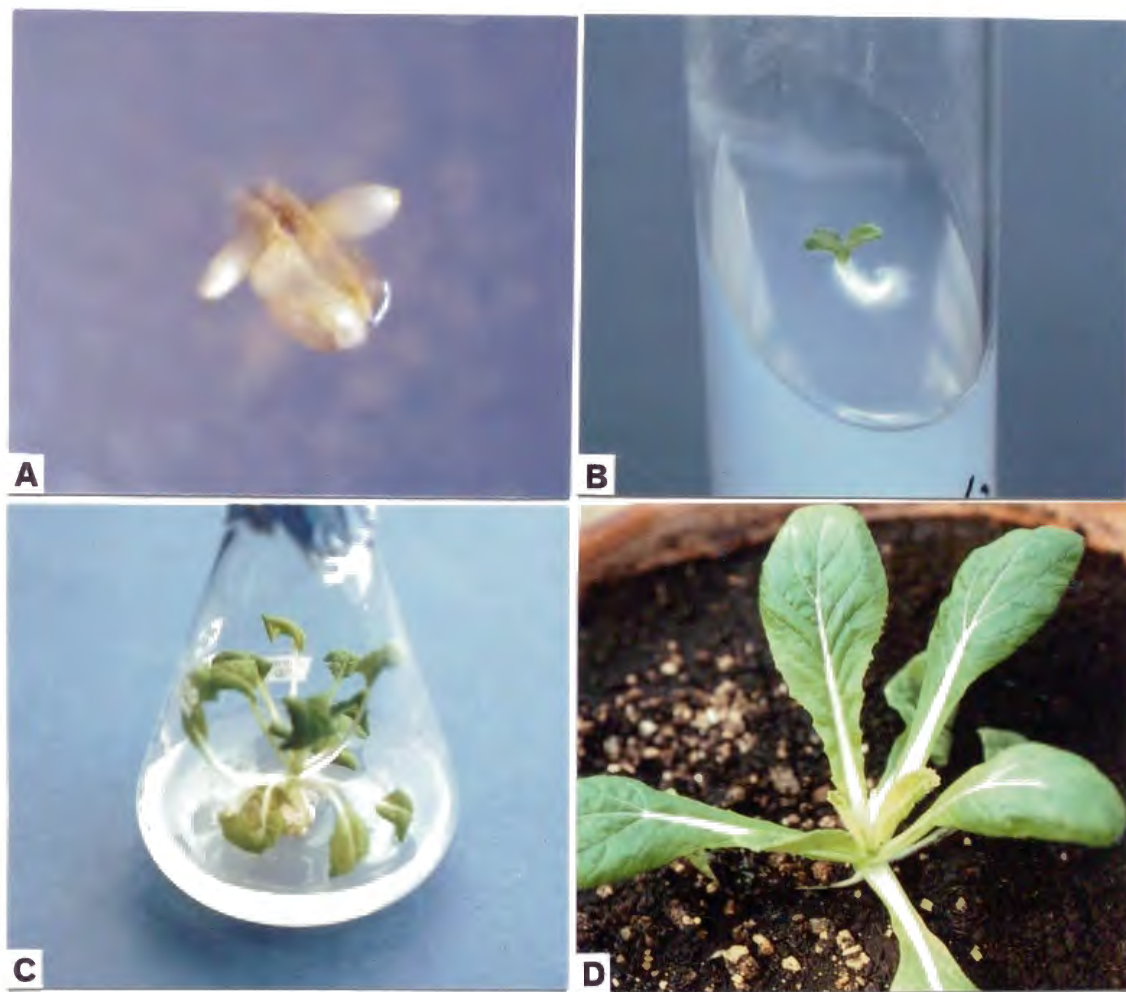


図1 ハクサイ（M46-7系統）葯からの胚様体発生と植物体再生

A: 葯からの胚様体発生 B: 胚様体の発育
C: 再生幼植物体 D: 鉢上げ個体



図2 キャベツ品種‘SE’薬からの胚様体発生と植物体再生

考察

本実験で用いた LS、Nitsch および B5 の各基本培地はいずれも植物の組織培養で広く使用される培地であり、*Brassica* 属植物の薬培養においてもその適用が検討されている。Thomas & Wenzel (1975) は LS を、Lichter (1981) は Nitsch を基本組成とする培地を用いて *B. napus* で、また Keller らは B5 培地の無機塩類濃度を若干変えた改変培地を用いて *B. campestris* (Keller ら, 1975)、*B. napus* (Keller & Armstrong, 1977) および *B. oleracea* (Keller & Armstrong, 1981) で胚様体を誘導している。これら 3 培地の無機塩組成については Nitsch < 改変 B5 < LS の順に塩濃度が高く、多量成分の中ではアンモニウム塩の含量が大きく異なる。改変 B5 培地でのみ胚様体の形成がみられ、その無機塩類濃度を下げると胚様体形成率が低下した本実験のハクサイ薬培養の結果は、胚様体形成に適する無機塩の濃度が一定の範囲内にあることを示唆する。同様な無機塩類の濃度効果は *B. juncea* の薬培養 (George & Rao, 1982) でも認められている。

無機元素の中でも窒素は多量要素として植物細胞の生長に大きな影響を及ぼす。多くの場合無機窒素は硝酸塩の形で施用されるが、アンモニウム塩などの還元態窒素と併用すると細胞の生長が促進されることも知られている (Gamborg & Shyluk, 1981)。イネの薬培養で Chu (1981) は高濃度 (28mM) の硝酸塩と低濃度 (3.5mM) のアンモニウム塩の組合せが花粉からのカルス形成に最適であり、アンモニア態窒素濃度の上昇は抑制効果を示すことを報告している。アンモニウム塩の減少が胚様体形成に負の影響を与えたチンゲンサイでの結果は、使用した改変 B5 培地のアンモニウムイオン濃度が、花粉の分裂に抑制効果を及ぼすレベルに達していないことを示唆するものである。また、高濃度で胚様体形成が促進されたキャベツでの結果を考え合わせると、*Brassica* 属の薬培養においてはアンモニア態窒素濃度を基本の 2mM より高めに設定するのがよいと推察される。

還元態窒素元としてはアミノ酸の添加効果も検討されており、Keller ら (1975) はグルタミンの添加が *B. campestris* 薬からの胚様体誘導に有効であることを報告している。また、セリンについても *B. napus* の薬培養での施用が報告されている (Keller & Armstrong, 1977; Keller & Armstrong, 1978)。本研究ではこれら報告に習って、改変 B5 培地に 800mg/l グルタミンおよび 100mg/l セリンを添加したが、その有効性については判然としなかった。

(2) 糖の種類と濃度

材料および方法

野菜花き試験場育成のハクサイ M46-7 系統を供試し、1 核期の薬をショ糖濃度を 6、8、10 および 12% に調整した改変 B5 培地に置床した。2,4-D と NAA はそれぞれ 0.1mg/l の濃度で組合せて添加した。また、チンゲンサイ Pa43-74 系統薬を 0.2~0.5 M のショ糖、ブドウ糖、果糖あるいはマンニトール (糖アルコール) を含む改変 B5 培地で培養した。2,4-D と

NAAは各1mg/lを組合わせて添加した。材料の育成、殺菌および培養方法等は前項に準じた。またC3-4-12系統（根こぶ病抵抗性カブ‘Gelria R’と千歳系ハクサイとのBC₃S₃）について、1mg/l 2,4-D、1mg/l NAAおよび10%シヨ糖を添加した改変B5培地で形成された胚様体を、大きさ別に2、4あるいは6%のシヨ糖を含むLS培地に移植して発育状況を調査した。

結果

シヨ糖濃度の胚様体形成に及ぼす影響については、10%添加培地が形成率1.7%で最も高く、次に8、12および6%添加培地の順となった（表6）。しかし最低の6%添加培地でも1.0%の胚様体形成率を示し、濃度間で大きな差は認められなかった。胚様体数は10%添加培地で最も多く、複数個の胚様体を発生する葯がみられたのに対し、6、12%添加培地では単独発生のみであった。高シヨ糖濃度培地では葯表面組織からのカルス形成が抑えられる傾向が認められた。

糖の種類に関しては、表7に示すようにシヨ糖、ブドウ糖あるいは果糖を添加した培地で胚様体の発生が認められた。胚様体形成率ではブドウ糖がシヨ糖および果糖に優った。ブドウ糖添加培地においては0.2および0.3Mの濃度で胚様体形成率が高く、9%前後の値を示した。0.4M以上になると胚様体形成率および数ともに著しく低下し、同様な傾向は果糖においても認められた。糖アルコールのマンニトールを添加した培地では胚様体の発生が認められず、カルス形成もみられなかった。

移植時の胚様体の大きさによりその後の発育に違いが生じた（表8）。長径が0.5mm以下（球状胚）では胚発育が進まず、発育停止あるいは枯死するものが多かったのに対し、0.5～1.5mm（球状～魚雷型胚）では正常な発育をする胚様体が多く、植物体再生率が高かった。また大きく生長した胚様体は異常発育する傾向にあり、2mm以上のものは子葉が癒着したり、胚軸が異常肥大して奇形化を呈し、正常な植物体となる率が低かった。移植培地のシヨ糖濃度の影響に関しては、0.5mm以下の小球状胚において低濃度培地での植物体再生率が高い傾向が認められた。全体として2および4%添加培地では正常植物体へと発育する胚様体の割合が約1/4で大差なく、6%添加培地でやや低率となった。

表6 胚様体形成に及ぼすシヨ糖濃度の影響（ハクサイ M46-7 系統）

シヨ糖濃度 %	置床 葯数	カルス 形成葯数	胚様体 形成葯数	胚様体 形成率 %	胚様体数
6	300	19	3	1.0	3
8	304	20	4	1.3	10
10	302	7	5	1.7	23
12	190	0	2	1.1	2

表7 胚様体形成に及ぼす糖の種類と濃度の影響 (チンゲンサイ Pa43-74 系統)

糖の種類	濃度 M (重量%)	置床 薬数	カルス 形成薬数	胚様体 形成薬数	胚様体 形成率 %	胚様体数
ショ糖	0.2 (6.8)	146	13	4	2.7	19
	0.3 (10.3)	162	9	4	2.5	23
ブドウ糖	0.2 (3.6)	117	11	10	8.5	42
	0.3 (5.4)	116	1	11	9.5	61
	0.4 (7.2)	127	4	3	2.4	4
	0.5 (9.0)	117	0	0	0	0
果糖	0.3 (5.4)	147	3	7	4.8	16
	0.5 (9.0)	162	0	1	0.6	11
マンニトール	0.3 (5.5)	115	0	0	0	0
	0.5 (9.1)	147	0	0	0	0

表8 胚様体の発育に及ぼす移植培地シヨ糖濃度の影響 (ハクサイ C3-4-12 系統)

シヨ糖濃度 %	移植胚様体 の大きさ mm	移 植 個 数	発育停止 枯 死	異常肥大 奇 形	茎 葉 異常発育	正 常 植物体
2	< 0.5	32	17	3	3	9
	0.5 - 1.0	28	12	6	1	9
	1.0 - 1.5	19	1	7	2	9
	1.5 - 2.0	9	3	2	1	3
	2.0 - 2.5	8	3	5	0	0
	2.5 - 3.0	4	0	2	1	1
	3.0 <	15	0	10	3	2
4	< 0.5	46	32	6	2	6
	0.5 - 1.0	24	5	7	1	11
	1.0 - 1.5	18	4	6	2	6
	1.5 - 2.0	7	1	3	2	1
	2.0 - 2.5	9	0	4	2	3
	2.5 - 3.0	5	0	3	1	1
	3.0 <	13	0	9	1	3
6	< 0.5	34	25	5	2	2
	0.5 - 1.0	25	6	7	3	9
	1.0 - 1.5	18	0	7	4	7
	1.5 - 2.0	5	0	4	0	1
	2.0 - 2.5	4	0	4	0	0
	2.5 - 3.0	7	0	4	2	1
	3.0 <	14	0	11	2	1

考察

糖は炭素源として利用され、従属栄養細胞の生育に欠かすことのできない培地成分である。糖の種類についてはショ糖の使用が最も多く、通常、培地中2～3%の濃度で添加される。薬培養においてもその安定した効果からショ糖が一般に用いられるが、添加濃度は植物種により一定していない。

*Brassica*の薬培養においては、Keller ら (1975) が *B. campestris* (ナタネ) で糖濃度の上昇により胚様体形成が促進される傾向を認め、10%という高濃度のショ糖の添加が胚様体の誘導に最も効果的であることを示して以来、高糖濃度培地が用いられる。胚様体誘導に適するショ糖濃度は4%以上とされ (Keller ら, 1983)、6～12%で胚様体形成率に大差が認められなかった本実験の結果は、これらが適濃度範囲にあることを示すものである。形成胚様体数からみた場合、ハクサイ薬培養での最適ショ糖濃度は10%と推定され、これは上述の同種のナタネに関する報告と一致する。一方、Lichter (1981) は *B. napus* 薬の液体培養で8%のショ糖添加が10%に優るとしており、Roulund ら (1991) はキャベツの薬培養で供試3タイプの最適ショ糖濃度に11.4～18%のばらつきがあることを示し、各遺伝子型を平均した最適濃度を $14.2 \pm 0.1\%$ と推計している。

このように、*Brassica* 薬培養での糖の果たす役割は大きい、その最適濃度は必ずしも一定でなく、胚様体を効率的に誘導するためには供試材料や培養方法を考慮した糖濃度の設定が必要と思われる。

糖の種類に関して、胚様体形成に及ぼすショ糖の効果はブドウ糖により置き換えられるが、麦芽糖やラフィノースでは代用できないことが Keller ら (1975) により報告されている。ここでのチンゲンサイの薬培養の結果ではブドウ糖および果糖がショ糖と同等かそれ以上の胚様体誘導効果を示し、ショ糖の効果はその構成要素の両単糖類により代用され得ることが判明した。またこれら糖についてはいずれも適濃度が0.2～0.3Mであることから、糖濃度はモル濃度を基準に設定する必要があると判断された。

培地糖濃度の効果については糖そのものの炭素源としての利用効率のほか浸透圧調節を通して種々の生理作用にも影響を及ぼし、高濃度条件下では浸透圧の増大により細胞内への無機養分、生長調節物質等の取り込み効率が抑制されることも知られている (Chen, 1986)。糖濃度が小胞子の分裂および分化にどのように関わっているか詳細は不明であるが、ジャガイモで認められる同様な高濃度糖による胚様体形成促進効果 (Sopory ら, 1978) からは、小胞子分化に対するより普遍的な糖の作用機作の存在がうかがわれる。

形成された胚様体は高糖濃度培地で培養を継続すると褐変枯死してしまうため、糖濃度を下げた培地に移される。移植培地糖濃度としてはショ糖2% (0.06M) が多く用いられる (Keller ら, 1975; Keller & Armstrong, 1977, 1979; Lichter, 1981)、本実験においても既報と同様2%ショ糖添加培地で未熟な胚様体からの植物体再生率が高い傾向を認めた。

低糖濃度培地移植時の胚様体の大きさとしては、0.5～1.5mmの心臓型ステージ前後のも

のが適し、また未発育の小球状胚の発育停止および枯死がシヨ糖濃度が低い培地で少ない傾向がみられたことから、特に胚発育前期での低糖濃度への転換が重要と考えられた。胚様体からの植物体再生効率を上げるために、培養薬を置床1～2週間後に低糖濃度培地に移す方法も試みられている（Keller & Armstrong, 1977）が、好結果は得られておらず、糖濃度の転換時期に関してはさらに検討を要する。

（3）植物生長調節物質の種類と濃度

材料および方法

ハクサイの1品種および3系統の個体から採取した薬を、植物生長調節物質の種類および濃度を変えて添加した改変B5培地に置床して、胚様体の発生状況を調べた。品種‘初風’についてはオーキシンの2,4-DおよびNAA各0.1、1.0mg/lの組合せまたは単独添加培地を、C15-3およびM46-7系統については2,4-DおよびNAA各1.0、2.0、5.0、10.0mg/lの組合せ添加培地を使用した。C3-4-12系統については2,4-DおよびNAA各1.0mg/lとサイトカイニン類のKIN（カイネチン）0.1、0.5および1.0mg/lの組合せ添加培地を使用してその影響を調査した。また2,4-DとNAA各0.2あるいは1.0mg/lの組合せ培地で形成されたC3-4-12系統の球状～魚雷型ステージの胚様体をシヨ糖濃度2%の生長調節物質無添加LS培地に移植して、初期培養の生長調節物質がその後の胚発育、植物体再生に及ぼす影響を調べた。

結果

表9に‘初風’におけるオーキシン濃度の影響を示した。胚様体形成率についてみると、無添加培地が0.4%であったのに対し、2,4-DとNAA各0.1mg/lを組合せた培地が3.1%、1.0mg/lを組合せた培地が5.1%とオーキシン濃度の上昇に伴い胚様体の発生が増加した。両物質の中では2,4-Dの効果がより大きく、1.0mg/l単独添加培地での胚様体形成率は6.2%とNAAとの組合せ培地より高い率を示した。また、2,4-Dの添加は胚様体の形成を促す一方で薬壁組織のカルス化を招いた。

高濃度のオーキシンの影響については、表10に示すとおり系統により傾向が異なり、M46-7系統では2,4-DおよびNAA各5.0mg/l以上の濃度培地で胚様体発生がみられなかったのに対し、C15-3系統では5.0および10.0mg/l添加培地で胚様体形成率が増加した。

表11にC3-4-12系統におけるオーキシンとサイトカイニンの組合せ効果を示した。2,4-DとNAA各1.0mg/lにKINを加えた培地での胚様体形成率は8.1～14.2%で、2,4-DとNAAの組合せ培地に比べて増加したが、NAA1.0mg/l単独添加培地の16.9%には及ばなかった。KIN濃度の影響に関して胚様体形成率では一定の傾向を認め難かった。胚様体数については0.1mg/l添加培地が1薬当たり約0.8個と他区に比べて多い値を示した。

薬培養培地の2,4-DおよびNAA濃度により移植後の胚様体の発育様相が異なり、1.0mg/l 添加培地由来の胚様体は子葉が異常肥大して奇形化しやすく、0.2mg/l 培地由来の胚様体は本葉は展開するが叢状となるものが多かった（表12）。

表9 胚様体形成に及ぼすオーキシンの影響（ハクサイ品種‘初風’）

オーキン mg/l		置 床	胚 様 体	胚 様 体	胚様体数
2,4-D	NAA	薬 数	形成薬数	形成率 %	
-	-	257	1	0.4	1
0.1	0.1	260	8	3.1	11
1.0	-	259	16	6.2	24
-	1.0	270	3	1.1	3
1.0	1.0	277	14	5.1	19

表10 胚様体形成に及ぼす高濃度オーキシンの影響（ハクサイ）

系 統	オーキン mg/l		置 床 薬 数	胚 様 体 形成薬数	胚 様 体 形成率 %	胚様体数
	2,4-D	NAA				
C15-3	1.0	1.0	100	0	0	0
	2.0	2.0	100	1	1.0	1
	5.0	5.0	100	2	2.0	2
	10.0	10.0	200	4	2.0	24
M46-7	1.0	1.0	218	6	2.8	14
	2.0	2.0	213	4	1.9	27
	5.0	5.0	224	0	0	0
	10.0	10.0	232	0	0	0

表 11 胚様体形成に及ぼす植物生長調節物質の影響 (ハクサイ C3-4-12 系統)

生長調節物質 mg/l			置 床	胚 様 体	胚 様 体	胚様体数
2,4-D	NAA	KIN	葯 数	形成葯数	形成率 %	
1.0	—	—	205	20	9.8	78
—	1.0	—	183	31	16.9	113
1.0	1.0	—	103	6	5.8	9
1.0	1.0	0.1	190	27	14.2	148
1.0	1.0	0.5	136	11	8.1	22
1.0	1.0	1.0	221	24	10.9	48

表 12 葯培養培地植物生長調節物質濃度が移植後の胚様体の発育に及ぼす影響 (ハクサイ C3-4-12 系統)

生長調節物質 mg/l		移 植	発育停止	異常肥大	茎	葉	正 常
2,4-D	NAA	個 数	枯 死	奇 形	異常発育		植物体
0.2	0.2	105	41	18	14		32
1.0	1.0	139	61	36	6		36

考察

オーキシンおよびサイトカイニン等の植物生長調節物質は、培養細胞・組織の分裂あるいは分化の制御に広く利用される。*Brassica* 属植物の花粉の分裂あるいは胚様体形成にはこれらの物質が必ずしも不可欠の要素でないことが、Lichter (1989) および佐藤ら (1989) の小孢子培養により明らかにされている。本実験の葯培養でもごく低率ではあるが生長調節物質無添加培地で胚様体形成を認めた。しかし、生長調節物質無添加に比べて添加した培地では胚様体形成率が著しく増加し、これら物質が胚化促進に有効に作用していることが示された。

Brassica 属植物の葯培養における胚様体形成促進には主としてオーキシンの利用される。*B. campestris* (Keller ら, 1975; Keller & Armstrong, 1979) および *B. napus* (Keller & Armstrong, 1977, 1978) では低濃度 (0.1mg/l) の 2,4-D と NAA を組合せた培地が、また *B. oleracea* (Keller & Armstrong, 1983; Arnison & Keller, 1990; Phippen & Ockendon, 1990) では両物質の濃度を上げた (0.3~1.0mg/l) 培地が使用され、種により適用濃度が異なる傾向がみられる。

ハクサイでは同種のナタネ (*B. campestris*) での報告 (Keller ら, 1975) に準じて 0.1mg/l の 2,4-D と NAA を添加した培地を基本に培養が行われる (Sato ら, 1989)。本供試品種および系統においては、総じて 2,4-D および NAA 各 1.0mg/l あるいはそれ以上の濃度で胚様体形成率が高く、供試材料により適するオーキシン濃度が異なった。このようなオーキシン効果の差は花粉供与植物の内生ホルモンレベルに起因するものと推察され、胚様体の効率的誘導には材料の遺伝子型あるいは育成条件に応じた濃度設定が重要と考えられた。

サイトカイニンとはオーキシンとの相互作用を通じて胚様体形成に影響を及ぼすと考えられるが、本実験では KIN 濃度が相対的に低い培地で多数の胚様体が形成され、Lichter (1981) による *B. napus* での薬培養結果と同様な傾向を認めた。一般に *Brassica* の薬培養では相対的にオーキシンレベルが高い場合に胚様体形成が促進される傾向があり、プロッコリーでの BA による抑制効果 (Keller & Armstrong, 1983) もオーキシンおよびサイトカイニン両生長調節物質濃度の相対比で説明される。

胚様体形成における植物生長調節物質の作用性に関しては、植物種により胚発生が生長調節物質に依存するものとししないものがあり、前者ではオーキシンは花粉小胞子の初期分裂および胚化促進に、サイトカイニンは形成胚細胞の分裂持続に作用し、その後胚様体はこれら物質に依存せずに発育を続けるとする Heberle-Bors (1985) の指摘がある。半数体の効率的作出の点からも Heberle-Bors の指摘は興味深く、花粉の分裂、胚化あるいは胚発育の各段階での生長調節物質の関わりについては精査を要する。

3 培養環境

材料および方法

ハクサイ M46-7 系統とキャベツ (BFCR×EFPR)-87 系統から採取した薬を 2,4-D および NAA 各 1mg/l を添加したショ糖 10% の改変 B5 培地に置床した。置床薬は 35℃・暗黒条件下で 0、1、3 あるいは 5 日培養した後、25℃・暗黒下に移して培養を継続し、高温前培養の胚様体形成に及ぼす影響を検討した。また、ハクサイ C3-4-12 系統およびキャベツ (BFCR×EFPR)-87 系統について、上記培地を用いて、35℃・暗黒条件で 1 日前培養した薬を 25℃暗黒または約 2000lx・16 時間照明下に移して培養を続け、光の有無が胚様体形成に及ぼす影響を検討した。

結果

高温前培養の影響を表 13 に示した。ハクサイおよびキャベツともに 25℃ で連続して培養した場合には胚様体の発生は全く認められなかった。ハクサイ M46-7 系統では 35℃・1、3 日間、キャベツ (BFCR×EFPR)-87 系統では 1 日の前培養を行った薬で胚様体の発生がみ

られ、高温前培養による胚形成促進効果が認められた。ハクサイでは 35℃・1 日処理が 3 日処理に比べて高い胚様体形成率を示した。光条件についてハクサイ C3-4-12 系統では暗黒および 16 時間照明区の胚様体形成率がそれぞれ 5.0 および 4.0% とわずかに暗黒区が高かったが、大差なく、胚様体数も両区同程度であった（表 14）。キャベツ (BFCR×EFPR)-87 系統では逆に照明区で胚様体形成率が高かったが、ハクサイと同様、明暗両区間での顕著な差は認められなかった。

表 13 胚様体形成に及ぼす高温前培養の影響

種 類 系 統	培 養 温 度	置 床 薬 数	胚 様 体 形成薬数	胚 様 体 形成率 %	胚様体数
ハクサイ M46-7	25℃	203	0	0	0
	35℃・1 日→25℃	204	3	1.5	4
	35℃・3 日→25℃	200	1	0.5	2
	35℃・5 日→25℃	204	0	0	0
キャベツ (BFCR×EFPR)-87	25℃	100	0	0	0
	35℃・1 日→25℃	300	4	1.3	7
	35℃・3 日→25℃	300	0	0	0
	35℃・5 日→25℃	100	0	0	0

表 14 胚様体形成に及ぼす培養光条件の影響

種 類 系 統	光 条 件	置 床 薬 数	胚 様 体 形成薬数	胚 様 体 形成率 %	胚様体数
ハクサイ	暗 黒	221	11	5.0	52
C3-4-12	16h 照明	200	8	4.0	47
キャベツ	暗 黒	190	1	0.5	2
(BFCR×EFPR)-87	16h 照明	192	3	1.6	4

考察

培養初期の短期間の高温処理により花粉からの胚様体形成が著しく促進されることを Keller & Armstrong (1978) が *Brassica napus* の薬培養で報告して以来、*Brassica* 属の薬・花粉培養では高温前培養の適用が一般化している。高温処理条件については種間差が

認められ、*B. napus* (Keller & Armstrong, 1978) では 30℃・7～14 日間の処理が効果が
高いのに対し、*B. campestris* (Keller & Armstrong, 1979)、*B. oleracea* (Keller & Armstrong,
1981; Keller & Armstrong, 1983; Chiang ら, 1985; Arnison & Keller, 1990)、*B.*
hirta (Klimaszewska & Keller, 1983) および *B. juncea* (Sharma & Bhojwani, 1985) で
は 35℃・1～5 日間の高温前培養が有効とされる。35℃・1 日の前培養がハクサイおよび
キャベツの葯からの胚様体形成を促進したここでの結果はこれまでの報告と傾向を一にす
るものであり、この高温処理条件の有効性はその後の葯培養実験でも確認されている。

一方、花粉培養ではいずれの種も 32～33℃を胚形成の適温としており (Chuong &
Beverdors, 1985; Fan ら, 1988; 佐藤ら, 1989)、花粉細胞の分裂・分化に直接的な
作用を及ぼす温度域は比較的狭いと考えられる。また胚様体形成に関し、置床葯を速やか
に高温条件下に移した方が効果が大きく (Keller ら, 1983)、花蕾の高温前処理は効果が
ない (Klimaszewska & Keller, 1983) とする報告からは、高温は葯が植物体組織から切り
離された初期の段階に、より強く作用することが推察される。

高温の作用機作に関しては、微小管の分解と紡錘体の転移を誘起し、結果として生じた
核の異常分裂が胚形成を促す (Bajaj, 1983) との見方もあるが、詳細は明らかでない。

置床葯は Keller ら (1975) および Thomas & Wenzel (1975) の報告に従って通常暗黒条
件で培養され、胚様体形成後に照明下に移される。胚様体形成率および数が明暗両区で大
差ない本実験の結果は、光が胚発生要因として必ずしも重要ではないことを示唆するもの
である。なおハクサイの花粉培養において、暗黒下で形成された胚様体は照明下形成のも
のよりその後の胚の生育が揃うとする報告 (佐藤ら, 1989) もあり、植物体再生をも考慮
した光条件の検討が今後必要である。

第2節 再生個体の染色体数および一般特性

材料および方法

葯培養により作出したハクサイ C3-4-12 系統の胚様体経由の再生植物体をガラス温室内
でパーミキュライトを詰めた容器に植え出して順化した後、12cm 径の黒ポリポットに鉢上
げた。活着後、根端を採取し、0.002 M の 8-オキシキノリン液に 4 時間浸漬して前処理
を行った。前処理した根端組織は水洗後ろ紙上で水分をよく切り、エタノール:酢酸=3:
1 液中で固定した。染色はフォイルゲン法により行った。すなわち、固定組織を蒸留水で 5
分間・2 回水洗してから 60℃の 1 N 塩酸中で 10 分の解離処理を行い、10 分間の水洗の後、
シッフの試薬に 2～3 時間浸漬して染色した。染色根端組織はスライドグラス上で押しつ
ぶして標本を作成し、検鏡した。また、倍数性の異なる再生植物体は抽苔、開花後、花器
の大きさを調査し、自然倍加した 2 倍体 (20 個体) については蕾、開花授粉により自家不
和合性検定を行った。蕾授粉で得た自然倍加 2 倍体の自殖後代については、ほ場において

形態および生育特性を調べた。

結果

再生植物体の染色体および染色体数分布を図3および4に示した。57個体中、半数性($x=10$)の染色体数を有したものは20で、その割合は35%であった。自然倍加の2倍体($2x=20$)は31個体、3倍体($3x=30$)は4個体、4倍体($4x=40$)は2個体で、2倍体が全体の半数以上を占めた。また、低頻度ではあるが、再生個体の中に x 、 $2x$ 細胞あるいは $2x$ 、 $3x$ 細胞をキメラに有する混数体も認められた。

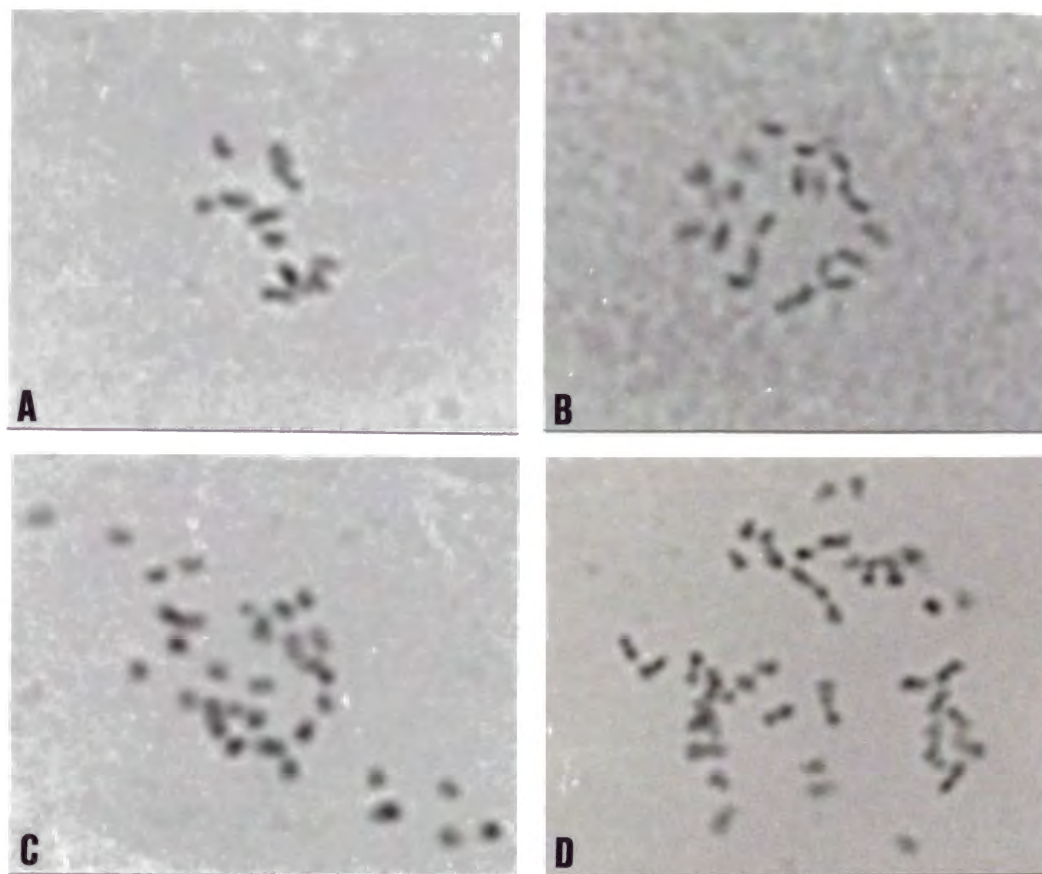


図3 ハクサイ薬培養再生個体の染色体

- A: 半数体 ($n=10$) B: 2倍体 ($2n=20$)
C: 3倍体 ($3n=30$) D: 4倍体 ($4n=40$)

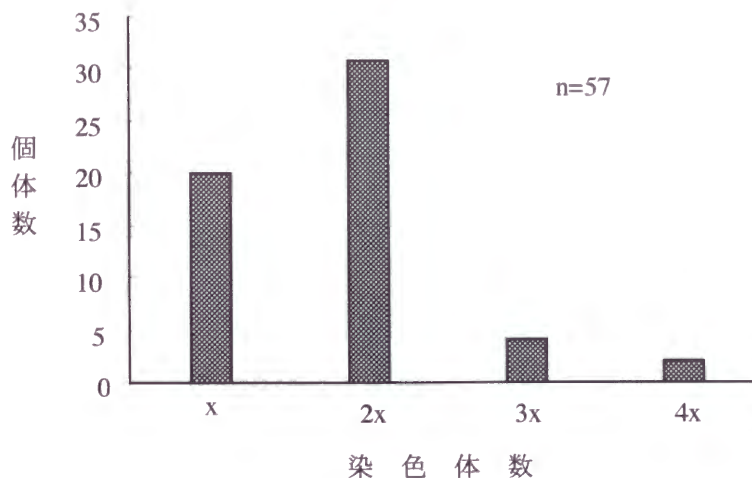


図4 再生個体の染色体数（キメラ個体は除く）

半数体は栄養器官、生殖器官ともに生育量が小さく（表15、図5および6）、葯が退化し、稔性を欠いた。自然倍加した2倍体は通常の2倍体と同様、正常に発育して自家（蕾）授粉あるいは他家授粉により稔実種子を着けた。4倍体は旺盛な生育を示し、2倍体に比べて大きな蕾と花卉を着けた。しかし、稔性は低く、自家受粉でわずかの種子を得るに止まった。3倍体については2倍体と同程度の大きさの花器を有し、花粉形成を認めたが、不稔であった。

自然倍加2倍体は蕾授粉で稔実種子を着生したが、開花授粉では不稔性を示し、検定した20個体全てが自家不和合性と判定された。

自然倍加2倍体自殖後代（倍加半数体系統）はいずれも斉一な生育を示し、系統内での形態および結球性等の揃いは良好であった（図7）。

表15 再生個体の染色体数と花器の大きさ

染色体数	花卉長 mm	花卉幅 mm	柱頭長 mm
10 (x)	7.9±0.7	6.0±0.8	4.8±0.4
20 (2x)	10.8±0.7	7.6±1.0	6.5±0.5
30 (3x)	11.0±1.0	7.5±0.5	6.3±0.8
40 (4x)	12.1±0.5	10.8±0.7	6.5±0.4



図5 ハクサイの半数体（左）と2倍体（右）の草姿（抽苔・開花時）



図6 ハクサイの薬培養再生個体の花器

左より半数体、2倍体、3倍体、4倍体



図7 ハクサイ倍加半数体系統の生育

考察

薬培養により作出した花粉起源植物体は必ずしも半数性でなく、様々な染色体レベルを示すことが多くの植物種で認められている (McComb, 1978; Bajaj, 1983)。Brassica に関しては *B. oleracea* (Chiang ら, 1985; Ockendon, 1986)、*B. campestris* (Keller & Armstrong, 1979)、*B. napus* (Wenzel ら, 1977; Keller & Armstrong, 1978)、*B. juncea* (George & Rao, 1982) および *B. hirta* (Klimaszewska & Keller, 1983) で、それぞれ半数体以外に倍数体や異数体あるいは混数体が高頻度で出現することが報告されている。本実験においても倍数化傾向が明確に認められた。

倍数化の原因としては、異常減数分裂、核内分裂 (endomitosis)、分裂核の融合および生殖核における核内倍加 (endoreduplication) が考えられ、薬採取時期および培養条件等の要因がこれら発生メカニズムに影響を及ぼして倍数化を誘発するとされる (McComb, 1978)。また、異数体や混数体については花粉起源胚様体あるいはカルス細胞の初期段階での異常分裂に起因する (Chu, 1982) と推察される。

薬採取時期の影響に関しては、第Ⅱ (有糸) 分裂直前あるいは直後で半数体比率が最も高く、2核期では倍数化が生じやすいとするチョウセンアサガオとタバコでの報告 (Engvild ら, 1972; Engvild, 1974; Sunderland ら, 1974) がある。若い薬で半数体頻度が高い理由として、Sunderland ら (1974) は培養薬中での半数性胚様体と倍数性胚様体の競合をあげ、倍数化の過程で後者が前者に発育の遅れをとり淘汰されると推量している。一方、培養条件の影響に関しては、高温前培養が半数体頻度を高めるとする報告が *B. napus* (Keller &

Armstrong, 1978) および *B. campestris* (Keller & Armstrong, 1979) でなされている。これら要因との関連でみた場合、本研究でのハクサイの薬培養は半数体が生じやすい条件で行われていると言え、同様な培養方法をとる *B. napus* (Keller & Armstrong, 1978) や *B. oleacea* (Chiang, 1985; Ockendon, 1986) および *B. juncea* (George & Rao, 1982) での半数体比率 (12~46%) を考えると、35% という半数体出現率は妥当な頻度とみることができる。

半数体の草勢は2倍体に比べて弱く、特に花器の大きさに関しては半数体と倍数体との間で明確な差が認められた。花器の大きさは環境の影響による変動が少ない形質であり、半数性の判定指標として用いることができる。実際、Keller & Armstrong (1978, 1979, 1981) および Matsumoto ら (1989) は *B. napus*、*B. campestris* および *B. oleracea* で小不稔花個体を半数体とみなして、染色体レベルの推定を行っている。半数体の判定指標形質としては、他に葉表皮孔辺細胞の長さや葉緑体数についての検討がそれぞれ芽キャベツ (Ockendon, 1986) とハクサイ (Hamaoka ら, 1991) で行われており、測定はやや煩雑であるが、これら形質を用いた倍数性の早期判定によって染色体倍加処理の必要性の有無を明らかにすることができるものと思われる。

ハクサイおよびキャベツなどアブラナ科野菜の自家不和合性は同型花型一孢子体型として分類され、その発現にS座の複対立遺伝子系の関与が知られる (角田, 1977)。倍加半数体は遺伝的に完全に固定しているため、柱頭も花粉も同じS遺伝子を有すると考えられる。従って理論的には全てが自家不和合性となるはずであり、事実、本実験で調べた倍加半数体はいずれも自家不和合性を示した。このような倍加半数体が必然的に自家不和合性となる遺伝的性質は、F₁親としての直接的利用を可能とすることから、育種上有利な属性と言える。

第2章 ハクサイの耐病性倍加半数体系統の育成

アブラナ科野菜の連作地帯では土壌伝染性病原菌による汚染が進行し、病害のまん延は生産を著しく不安定にしている。ハクサイにおいては、特に根こぶ病（*Plasmodiophora brassicae*）および黄化病（*Verticillium dahliae*）の被害が甚大で、両病害に対する有効な防除対策として抵抗性品種の育成が強く要望されている。

本章では薬培養を用いて根こぶ病および黄化病抵抗性系統より半数体を作成し、育成した倍加半数体系統について病害抵抗性の評価検討を行った。また、根こぶ病に関しては、菌の病原性との対応を考慮して、抵抗性の遺伝様式を分析した。

第1節 薬培養による倍加半数体の作出

材料および方法

根こぶ病抵抗性を有し、球形質および生育特性に優れた T-136 系統（根こぶ病抵抗性の欧州系カブ ECD02 の選抜系統 77b…野菜・茶業試験場育成…を素材とする F₁ 系統）、CRK-1 系統（根こぶ病抵抗性の欧州系カブ ‘Debra’ を素材として育成された品種 ‘CR 歓呼’ の自殖後代選抜系統）およびキャベツとの種間雑種由来で根こぶ病・黄化病複合抵抗性を有する EOC-4 系統（黄化病抵抗性キャベツ品種 ‘De Montage’ とハクサイ系統との種間雑種後代 BC₃S₂ 系統で、戻し交雑親として T-136 由来根こぶ病抵抗性倍加半数体系統を使用したもの）について、薬培養による半数体作出を試みた。系統 T-136 は 1988 年 2 月、CRK-1 は 1990 年 3 月および EOC-4 系統は 1992 年 2 月に薬培養を実施した。各系統ともガラス温室育成抽苔株から 1 核期ステージの蕾を採取し、殺菌後、薬を試験管内のショ糖 10% 添加改変 B 5 培地に置床した。生長調節物質としては 2,4-D と NAA を各 0.1~1mg/l の濃度で組合せて添加した。3 系統とも置床薬は 35℃・暗黒条件で 1 日前培養した後、25℃・16 時間照明（約 1000lx）下に移した。置床 3~4 週間後、薬内より発生した胚様体はショ糖 2% の L S 培地に移植して約 2000lx・16 時間照明下で培養を継続し、発育を促した。再生植物体はバーミキュライトに植え出してガラス温室内で 2 週間順化した後、8 号素焼き鉢に鉢上げした。鉢上げ個体の一部については 0.1% のコルヒチンを染み込ませた綿球を 4 日間頂芽部分にのせて染色体倍加処理を行った。

結果

供試した 3 系統の各培地における薬培養結果の合計を表 16 に示したが、系統により胚様体形成率に大きな差が認められた。高い胚形成能を示したのは T-136 で、3358 の置床薬の 4.9%（166 薬）が胚様体を形成した。胚様体形成薬の 7 割以上が複数個の胚様体を産し、中には 40 を超える大小様々なステージの胚様体を発生する薬も認められた（図 8）。形成胚

表 16 耐病性系統株からの半数体作出

系 統	供 試 個体数	置 床 薬 数	胚 様 体 形成薬数	胚 様 体 形成率 %	胚様体数	再 生 植物体数
T-136	4	3358	166	4.9	667	116
CRK-1	1	2863	10	0.3	23	3
EOC-4	8	2311	1	0.04	1	1

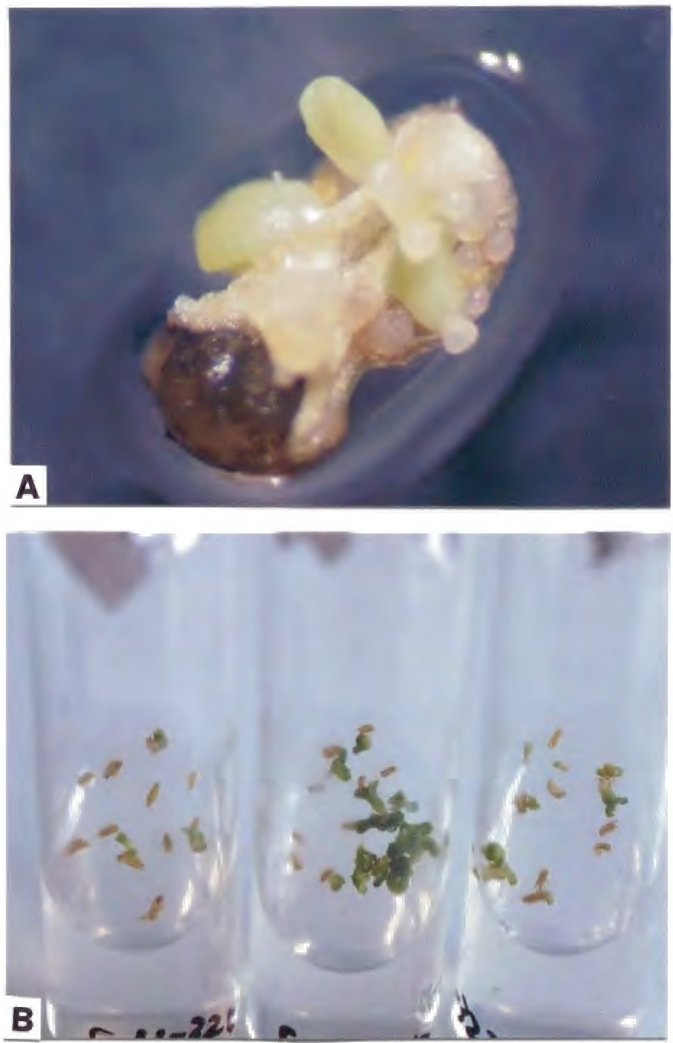


図8 ハクサイ T136 系統からの胚様体発生

A: 培養3週間後 B: 培養4週間後

様体 667 個のうち直接植物体に再生したものは 116 で、約半数の 60 個体を順化、鉢上げした。抽苔・開花後、花粉稔性を有する自然倍加株より自殖種子を得た。

CRK-1 系統では置床数 2863 の 0.3%、10 葯で胚様体の発生を認めた。形成された 23 個の胚様体の多くは、発育停止や組織の異常肥大、奇形化により個体再生に至らず、正常な植物体に発育したのは 3 胚様体に止まった。再生 3 個体のうち 2 個体は自然倍加の 2 倍体で、残り 1 個体は半数体であった。半数体についてはコルヒチン処理を行い、2 倍体を得た。

E0C-4 系統においては置床した 2311 の葯のうち胚様体を形成したのはわずか 1 葯で、魚雷型ステージの 1 胚様体の発生が認められた。形成胚様体は自然倍加の 2 倍体で、正常に発育して成体となり、自家授粉により稔実種子を着生した。

考察

供試 3 系統はいずれも耐病性の付与を主目標に育成されたものであるが、遺伝的背景は大きく異なる。供試系統間での胚様体形成率の差異は主としてその遺伝子型に起因し、それぞれの育成過程で用いた耐病性素材のカブ、キャベツおよびハクサイの品種・系統の胚形成能を反映した結果とも言える。

E0C-4 系統の低胚形成能に関してはキャベツ品種 ‘De Montage’ ゲノムの関与が推定されたが、キャベツゲノムそのものの影響によるものか、その組み込まれ方によるものかは明らかでない。いずれにせよ E0C-4 系統から多くの胚様体を作出することは困難で、目標形質を有する半数体を効率的に得るためには、新たな適培地条件の検索や他の分系での葯培養の適用についても検討する必要がある。

第 2 節 倍加半数体系統の耐病性検定

材料および方法

1989 年に T-136 系統から作出した 13 倍加半数体系統を供試して根こぶ病抵抗性検定をガラス温室内で実施した。検定には長野県望月町と真田町菅平で採取した 2 種類の根こぶ病菌、望月菌（‘さくみどり 3 号’ 罹病株より採取）および菅平菌（‘新理想’ 罹病株より採取）を用い、菌（孢子）密度を 5×10^6 /乾土 g に調製して病土挿入法（吉川ら, 1981）により接種した。播種（接種）は 6 月 20 日に行い、播種 1 カ月後に発病状況を調査した。

また、1993 年に CRK-1 系統由来の 2 倍加半数体系統 K-10、K-13 および E0C-4 系統由来の倍加半数体系統 0C-86 について、病土挿入法による根こぶ病抵抗性検定を実施した。検定菌には望月菌のほか真田町菅平で採取した根こぶ病抵抗性品種 ‘空海 65’ を侵す菌（空海寄生菌）を用い、 1×10^6 /乾土 g の菌密度で接種した。播種は 8 月 26 日とし、1 カ月後に発病状況を調査した。発病程度は Seaman ら（1963）および Williams（1966）の方法に基づいて下記の基準で評価し、発病度を算出した。

発病評点	発 病 程 度
0	根こぶの着生が認められない
1	細根にわずかの根こぶ小粒の着生が認められる
2	側根に肥大した根こぶの着生が認められる
3	主根、側根に著しく肥大した根こぶの着生が認められる

$$\text{発病度} = \frac{\Sigma (\text{発病評点} \times \text{評点ごとの個体数})}{3 \times \text{調査個体数}} \times 100$$

0C-86 系統とその F₁ 組合せ系統については、1995 および 96 年に黄化病汚染ほ場で黄化病抵抗性検定を行った。1995 年は小諸市柏木の強汚染ほ場で 0C-86 を組合せ親に用いた 4 F₁ 系統と民間種苗会社育成の 3 系統、2 品種を供試して検定を実施した。播種は 7 月 17 日、定植は 8 月 10 日で、10 月 11 日に調査を行った。調査個体数は各区 20～35 (3 反復) とした。1996 年は小諸市山浦の長野県営農技術センターの弱汚染ほ場で、0C-86 ほか育成 3 系統、民間種苗会社育成の 4 系統、1 品種を供試して検定を実施した。播種は 7 月 16 日、定植は 8 月 19 日で、10 月 21 日に調査を行った。調査個体数は各区 22～43 (3 反復) とした。地上部病徴は外観で、地下部病徴は地際部で切断した茎葉と主根維管束の褐変状態で、それぞれ調査した。発病程度は以下の基準で評価して発病度を算出した。

地上部	
発病評点	発 病 程 度
0	外葉黄化なし
1	外葉がわずかに黄化し、外葉および結球葉の一部が萎凋する
2	外葉の黄化が著しく、結球葉の一部が外側に展開して外観的に黄白色を呈する
3	株全体が黄化し、結球した葉の多くが外側に開いて下垂する

地下部	
発病評点	発 病 程 度
0	維管束褐変なし
1	地際茎、主根の維管束の一部に褐変がみられる
2	地際茎、主根の維管束の大部分に褐変がみられる
3	維管束の褐変が葉柄基部にまでみられる

発病度は根こぶ病と同様に算出

結果

T-136 由来の 13 倍加半数体系統の根こぶ病抵抗性を表 17 に示した。いずれの系統も菅平菌および望月菌に対して同様な抵抗性反応を呈し、その発病程度から、強抵抗性のもの 2、中程度の抵抗性のもの 8、抵抗性のないもの 3 の 3 群に分けることができた。強抵抗性の T136-8 と 136-41 系統は無発病の個体が多く、発病しても細根にわずかに根こぶ小粒がつく程度で、菅平および望月の両菌に対して、それぞれ発病度 10、20 以下の安定した抵抗性を示した。中抵抗性系統は概ね 30~40 の発病度であったが、発病評点で 1 の個体が多く、発病はするが根こぶの着生は少なかった。

CRK-1 および E0C-4 系統由来の倍加半数体系統 K-10、K-13 および 0C-86 の根こぶ病抵抗性を表 18 に示した。望月菌に対しては 3 系統とも強抵抗性で、K-10 および 0C-86 では発病個体が認められなかった。空海寄生菌に対して K-10 系統は無発病と発病評点 1 の個体がおおよそ半々で、発病度が 14 と強い抵抗性を示した。一方 K-13 および 0C-86 系統は全個体で肥大したこぶの着生がみられ、発病度 100 と全く抵抗性がなかった。

0C-86 系統の黄化病抵抗性に関しては表 20 に示すように、地上部発病度で同一素材由来の自殖選抜系統 E10-1 に若干劣るものの、外葉の黄化および地下部維管束の褐変程度が対照品種の‘優黄’や黄化病抵抗性の付与を目標に育成された試交系統に比べて低く、キャベツ品種‘De Montage’由来の抵抗性因子が保持されていることが認められた。0C-86 の黄化病抵抗性は、発病はするが病状の進展が遅い発病遅延型であり、対照品種に比べて根および茎導管部の褐変発生が遅く、導管褐変から外葉の黄化に至る時間も長い傾向にあった。また 0C-86 系統と‘De Montage’との種間交雑由来自殖選抜系統との F_1 組合せ系統は比較的安定した抵抗性を有し、1995 年の強汚染ほ場での検定では、地上部の黄化と地下部維管束の褐変病徴が対照品種のクロルピクリン処理区に匹敵する低い発病度を示した（表 19）。黄化病抵抗性因子を持たない K-13 系統との F_1 組合せ系統は発病度が高く、試交系統と同程度の弱抵抗性であった（表 19）。

表 17 倍加半数体系統の根こぶ病抵抗性

菌 系	系 統 品 種	調 査 個体数	発病評点別個体数				発病度
			0	1	2	3	
菅平菌	T136-1	12	3	9	0	0	25
	T136-3	17	0	17	0	0	33
	T136-5	18	0	0	0	18	100
	T136-6	21	2	15	0	4	43
	T136-7	15	0	15	0	0	33
	T136-8	17	14	3	0	0	6
	T136-11	23	1	0	5	17	88
	T136-13	14	3	11	0	0	26
	T136-30	26	0	0	13	13	83
	T136-33	22	0	22	0	0	33
	T136-41	23	17	6	0	0	9
	T136-282	19	0	19	0	0	33
	T136-309	15	1	13	0	1	36
	無双（対照）	27	0	0	0	27	100
望月菌	T136-1	30	9	20	1	0	24
	T136-3	30	5	25	0	0	28
	T136-5	31	2	4	3	22	82
	T136-6	38	12	22	2	2	28
	T136-7	24	8	16	0	0	22
	T136-8	34	22	12	0	0	12
	T136-11	26	0	1	7	18	88
	T136-13	27	8	18	1	0	25
	T136-30	36	0	0	14	22	87
	T136-33	37	14	23	0	0	21
	T136-41	32	24	8	0	0	8
	T136-282	29	11	18	0	0	21
	T136-309	30	13	17	0	0	19
	無双（対照）	26	0	0	0	26	100

表 18 倍加半数体系系統の根こぶ病抵抗性

菌 系	系 統	調 査 個体数	発病評点別個体数				発病度
			0	1	2	3	
望月菌	K10	18	18	0	0	0	0
	K13	17	15	1	1	0	6
	0C86	24	24	0	0	0	0
	郷風（対照）	31	2	1	4	24	87
空海寄生 菌	K10	53	31	22	0	0	14
	K13	35	0	0	0	35	100
	0C86	45	0	0	0	45	100
	空海 65（対照）	21	0	0	0	21	100

表 19 育成系統の黄化病抵抗性 （1995）

系 統 品 種	地 上 部		地下部維管束	
	発病率 %	発病度	発病率 %	発病度
K-13×0C-86	84	61	100	65
E9-1×0C-86	37	20	83	42
E9-3×0C-86	38	22	62	29
E9-4×0C-86	69	42	60	35
試交 A	68	38	100	83
試交 B	86	46	100	90
試交 C	87	57	93	78
大福 75（トホ種苗）	93	77	100	97
CR かなめ（ ）	93	83	100	92
CR かなめ*	63	21	47	21

E 系統はキャベツ品種 ‘De Montage’ との種間雑種後代 BC₄S₄系統

試交 A, B, C は民間種苗会社育成系統

*クロルピクリン処理併用

表20 育成系統の黄化病抵抗性 (1996)

系 品	統 種	地 上 部		地下部維管束*	
		発病率 %	発病度	発病率 %	発病度
0C-86		24	16	25	17
E10-1		14	6	-	-
E9-1-3×0C-86		29	18	67	52
E9-3-3×0C-86		28	15	58	36
試交 B		38	25	71	65
試交 C		60	41	74	59
試交 D		81	46	92	81
試交 E		39	25	63	58
優黄 (タキイ種苗)		68	33	74	51

E 系統はキャベツ品種 'De Montage' との種間雑種後代 BC₄S₅ 系統

試交 B, C, D, E は民間種苗会社育成系統

* - は調査なし

考察

T-136 は根こぶ病抵抗性を保有する系統を片親に用いた F₁ 系統であり、抵抗性因子がヘテロの状態にあるため、薬培養により育成された倍加半数体系統間で抵抗性に関しての分離が認められた。抵抗性素材として利用されたカブ 77b の抵抗性は単一の優性主働遺伝子により支配され、若干の微動遺伝子が抵抗性の発現に関与する (吉川, 1993) ことから、主働遺伝子が安定的に発現すれば倍加半数体では抵抗性と罹病性がおよそ 1 : 1 に分離すると考えられる。この分離比は強抵抗性系統と罹病性系統についてみればあてはまるが、中抵抗性のものを含めた抵抗性系統と罹病性系統の比は 10 : 3 と抵抗性側に多く偏った。このような分離の偏りは供試系統数が少ないことによる統計的誤差に起因するとの見方もできるが、胚形成能因子と抵抗性因子とが連鎖している可能性もあり、その原因についてはさらに詳細に検討する必要がある。

なお、検定に用いた菅平菌および望月菌に対しての各系統の同様な抵抗性反応結果から、両菌は病原性の類似した菌系に属することが推定された。

CRK-1 系統は品種 'CR 歓呼' の自殖後代で、根こぶ病抵抗性品種を侵す菌系を含むいくつかの菌系に対して抵抗性を示す個体を選抜したものであり、その薬培養から生じた倍加半数体系統はより広範な菌系に抵抗性を有することが期待される。CRK-1 系統由来の 2 倍加半数体系統のうち K-10 は根こぶ病抵抗性品種 '空海 65' に寄生する菌系 (空海寄生菌) に対して比較的強い抵抗性を示した。一方、K-13 系統は望月菌には抵抗性を示したが、空海寄生

菌に対しては抵抗性が認められなかった。この結果は CRK-1 系統の根こぶ病抵抗性が複数の因子により支配されていることを示唆するもので、‘CR 歓呼’の抵抗性素材 ‘Debra’ が独立に遺伝する 2 優性抵抗性遺伝子を有するとする報告 (Crute ら, 1980) と考え合わせると、CRK-1 がこれら因子をヘテロの状態に保有しているために抵抗性の分離が生じたものと考えられる。

倍加半数体系統 0C-86 は根こぶ病と黄化病に対しての複合抵抗性を有し、根こぶ病に関しては望月菌に対して強い抵抗性を示すなど、その親系統 E0C-4 の育成過程で戻し交雑親に用いた T-136 由来の倍加半数体 T136-8 系統の抵抗性因子が発現した結果となった。また黄化病抵抗性については発病遅延型であるため、土壌の汚染程度や栽培時期により発病状況は変動するとみられたが、2 カ年の汚染ほ場での F₁ 組合せ系統の比較的低い発病結果から、抵抗性強度に対しては一定の評価が与えられる。発病遅延には複数の因子が関与していると推察されるが、その作用性や遺伝性については不明の点が多く、今後、キャベツゲノム由来の因子が抵抗性発現にどのように関わっているかを明らかにしていく必要がある。なお、0C-86 系統を同じキャベツ ‘De Montage’ との種間交雑から派生した選抜系統と組合わせた場合、他の罹病性系統との組合わせに比べて黄化病抵抗性が強く発現したことから、抵抗性の安定化には F₁ 両親系への抵抗性因子の付与が必要と考えられた。

第3節 根こぶ病抵抗性の遺伝

材料および方法

根こぶ病に対して強い抵抗性を示した 3 倍加半数体系統 T136-8、K-10 および 0C-86 について、罹病性系統との組合せ後代を供試してガラス温室内で抵抗性検定を行った。

1992 年に T136-8 系統と根こぶ病罹病性の Q-5 系統 (品種 ‘オレンジクイーン’ 由来の倍加半数体系統) および両系統間の F₁、F₂、BC₁ を供試して望月菌に対する抵抗性検定を実施した。8 月 20 日に菌密度を 1.8×10^5 /乾土 g に調製した病土に各世代種子を播種し、1 カ月後に発病状況を調査した。

1993 年に K-10 系統と Q-5 系統および両系統間の F₁、F₂、BC₁ を供試して望月菌および空海寄生菌に対する抵抗性検定を行った。8 月 26 日に病土に播種し、1 カ月後に発病状況を調査した。接種菌密度は望月菌が 3.0×10^5 /乾土 g、空海寄生菌が 1.1×10^6 /乾土 g とした。

1996 年には K-10 × T136-8 および K-10 × 0C-86 という抵抗性系統間の F₁、F₂、BC₁ を供試して、望月菌および空海寄生菌に対する抵抗性検定を行った。両菌の菌密度は 3.0×10^5 /乾土 g とし、8 月 26 日に播種して、1 カ月後に調査を行った。また同時に望月菌および空海寄生菌について、Williams (1966) の 4 判別品種を用いてレース判定を試みた。

発病程度の評価方法は前節と同様に行い、James & Williams (1980) に従って発病評点 0、1 の個体を抵抗性、3、4 の個体を罹病性として遺伝解析を行った。

結果

検定に用いた望月菌および空海寄生菌のレース判定結果を表 21 に示した。望月菌に関しては判別品種 ‘Jersey Queen’ と ‘Laurentian’ が罹病性反応を、 ‘Wilhelmsburger’ が抵抗性反応を呈した。 ‘Badger Shipper’ のやや罹病性側に傾いた結果を合わせると、望月菌は Williams の分類によるレース 2 に該当した。空海寄生菌については ‘Laurentian’ が罹病性反応を示したのを除き、他の 3 品種では抵抗性と罹病性個体が分離し、レース 4 を基本に複数のレースが混在していることを示唆する結果となった。

望月菌に対する T136-8 系統の抵抗性の遺伝を表 22 に示した。罹病性の Q-5 系統との F₁ は大半の個体が無発病で、F₂ では抵抗性：罹病性＝147：60 に分離した。戻し交雑世代における抵抗性と罹病性の比は、戻し交雑親に T136-8 を用いた場合に 96：1 で、Q-5 を用いた場合では 47：57 であった。

K-10 系統の抵抗性の遺伝を表 23 に示した。望月菌に対して Q-5 との F₁ は約 7 割の個体が抵抗性、3 割が罹病性で、発病程度に幅がみられた。F₂ では抵抗性と罹病性が約 2：1 に分離した。空海寄生菌に対しては Q-5 系統との F₁ は大半が罹病化し、F₂ では抵抗性と罹病性が約 1：2 に分離した。BC₁ における抵抗性個体の比率は、×K10 で約 7 割、×Q-5 で約 3.5 割であった。

K-10 と T136-8 および K10 と 0C-86 間の交雑の F₁、F₂、BC₁ の望月および空海寄生菌に対する抵抗性を表 24 に示した。K-10 と T136-8 の F₁ は望月菌に対して抵抗性で、F₂ では抵抗性と罹病性個体が 126：9 に分離した。一方、空海寄生菌に対しては F₁ は抵抗性がなく、F₂ では抵抗性と罹病性が 31：37 に分離した。K-10 と 0C-86 間の F₁ は空海寄生菌に対して罹病性で、F₂ は K-10 と T136-8 の組合せに比べてやや罹病性側に偏る傾向を示した。

表 21 Williams 法による供試根こぶ病菌のレース判定

根こぶ病菌	判 別 品 種	調 査 個体数	発病評点別個体数				発病度	レ ー ス 判 定
			0	1	2	3		
望 月 菌	Jersey Queen	29	1	0	2	26	94	2
	Badger Shipper	23	8	2	4	9	54	
	Laurentian	19	0	0	1	18	98	
	Wilhelmsburger	12	11	1	0	0	3	
空海寄生菌	Jersey Queen	72	12	7	17	36	69	4 ?
	Badger Shipper	46	12	5	8	21	61	
	Laurentian	47	0	0	3	44	98	
	Wilhelmsburger	72	9	0	14	49	81	

Jersey Queen、Badger Shipper はキャベツ品種
Laurentian、Wilhelmsburger はルタバガ品種

表 22 倍加半数体系統 T136-8 における根こぶ病抵抗性の遺伝

世 代	調 査	発病評点別個体数				抵抗性:罹病性	χ^2	P
		個体数	0	1	2	3		
T136-8(P1)	96	95	1	0	0	96 : 0		
Q-5(P2)	87	0	0	4	83	0 : 87		
F ₁ (P1×P2)	120	119	1	0	0	120 : 0		
F ₂	207	125	22	11	49	147 : 60	1.75	0.20 - 0.10
BC ₁ (×P1)	97	96	0	0	1	96 : 1		
BC ₁ (×P2)	104	47	0	0	57	47 : 57	0.96	0.50 - 0.30

表 23 倍加半数体系統 K-10 における根こぶ病抵抗性の遺伝

菌 系	世 代	調 査	発病評点別個体数				抵抗性:罹病性
			個体数	0	1	2	3
望月菌	K10(P1)	51	51	0	0	0	51 : 0
	Q-5(P2)	42	0	0	0	42	0 : 42
	F ₁ (P1×P2)	56	27	13	8	8	40 : 16
	F ₂	158	95	9	10	44	104 : 54
	BC ₁ (×P1)	57	29	12	6	10	41 : 16
	BC ₁ (×P2)	73	13	14	3	43	27 : 46
空海菌 (菅平)	K10(P1)	52	32	19	1	0	51 : 1
	Q-5(P2)	56	0	0	0	56	0 : 56
	F ₁ (P1×P2)	46	3	2	2	39	5 : 41
	F ₂	304	49	42	28	185	91 : 213
	BC ₁ (×P1)	62	19	8	15	20	27 : 35
	BC ₁ (×P2)	81	0	1	4	76	1 : 80

表 24 倍加半数体 3 系統間の交雑後代における根こぶ病抵抗性の分離

菌 系	世 代	調 査 個体数	発病評点別個体数				抵抗性:罹病性
			0	1	2	3	
望月菌	T136-8(P1)	32	32	0	0	0	32 : 0
	K10(P2)	54	54	0	0	0	54 : 0
	F ₁	45	45	0	0	0	45 : 0
	F ₂	135	125	1	3	6	126 : 9
	BC ₁ (×P1)	67	67	0	0	0	67 : 0
	BC ₁ (×P2)	73	63	1	4	5	64 : 9
空 海	T136-8(P1)	30	0	0	0	30	30 : 0
寄生菌	K10(P2)	31	15	16	0	0	31 : 0
	F ₁	66	1	0	0	65	1 : 65
	F ₂	68	30	1	3	34	31 : 37
空 海	K10(P1)	24	22	0	2	0	22 : 2
寄生菌	OC86(P2)	26	0	0	0	26	0 : 26
	F ₁	45	0	0	0	45	0 : 45
	F ₂	85	23	2	14	46	25 : 60

考察

供試系統の抵抗性因子はいずれも欧州の飼料用カブ由来のものであり、T136-8 系統は Buczacki ら (1975) が提唱した ECD (European Clubroot Differential) 法による根こぶ病菌レース判別系統 ECD02 (AAbbCC) の選抜系 77b からの、K-10 系統は 'Debra' からの抵抗性因子をそれぞれホモの形で保有していると判断される。一方、検定に用いた根こぶ病菌については、望月菌が Williams の分類によるレース 2 に、空海寄生菌がレース 4 を主体とする菌系に属することが示されたが、レース 2 はわが国の根こぶ病の主要な菌系であり、またレース 4 はハクサイの抵抗性品種を侵す菌として位置づけられている (吉川, 1991)。これら根こぶ病菌系に対して T136-8 と K-10 が異なる抵抗性反応を呈したことは、両系統の抵抗性因子が異質なものであることを示唆する。

B. campestris の根こぶ病抵抗性の遺伝に関しては、これまで欧州のカブを中心に検討が行われ、病原菌との相互作用の中で、少なくとも独立に遺伝する 3 優性抵抗性遺伝子の存在が明らかにされている。Wit (1964)、Toxopeus & Janssen (1975) および Crute ら (1980) は 3 遺伝子 A、B および C の異菌系に対する抵抗性反応を、また James & Williams (1980) は抵抗性遺伝子 Pb1、Pb2 および Pb3 と形態的形質の連関について報告している。A、B、C と Pb1、Pb2、Pb3 との関係は明らかにされていないが、相互に対応している可能性は大きい。

これらの報告と系統育成経過から類推すると、T136-8系統の抵抗性は上述のAおよびC遺伝子に拠る可能性が大きく、その抵抗性素材 77b を罹病性ハクサイに交雑した場合にレース2菌に対する抵抗性が1優性主働因子支配型で遺伝する（吉川, 1993）ことから、望月菌に対してはAあるいはCが主働因子として作用していると推察される。なお、空海寄生菌に対するT136-8の抵抗性反応からは、AおよびC遺伝子はレース4に対しては抵抗性を示さないことがうかがわれる。

K-10系統の抵抗性は罹病性Q-5系統との交雑後代において望月菌と空海寄生菌では異なる分離反応を呈し、望月菌では優性に、空海寄生菌では劣性的に発現した。両菌系に対する抵抗性反応およびT136-8系統との交雑 F_2 世代での望月菌に対する抵抗性分離状況から、K-10はT136-8の抵抗性因子とは独立に遺伝する作用性の異なる主働因子を有するものとみられ、その抵抗性素材‘Debra’が優性抵抗性遺伝子AとBを有する（Cruteら, 1980; Toxopeus & Janssen, 1975）ことを考え合わせると、K-10の主働抵抗性遺伝子がB（あるいはA）であるとの推定も成り立つ。望月菌に対するK-10の主働抵抗性遺伝子の効果は優性的ではあるが、Q-5との F_1 においては罹病個体も多く発生し、ヘテロ状態で抵抗性発現が不安定となる傾向が認められた。また、 F_2 、 BC_1 世代における抵抗性の分離は複雑で、主働遺伝子の効果のみで抵抗性発現を説明することが困難であった。このような複雑な抵抗性発現の背景には他の抵抗性因子の存在や接種菌中での病原性の異なる菌の混在の関与があると推量される。空海寄生菌に対してK-10はQ-5との交雑後代で劣性遺伝子支配型の抵抗性反応を呈し、抵抗性遺伝子がホモでないと罹病化することが明らかにされたが、T136-8とOC-86系統との交雑後代での抵抗性分離結果からは、主働因子がヘテロでも両系統の抵抗性遺伝子の存在様態によっては抵抗性となり得ることが示唆された。

以上のように、根こぶ病に関しては抵抗性発現が複雑で、抵抗性に関与する遺伝子数やその作用性について不明な点が多く残された。特に根こぶ病菌は活物寄生で、単一遺伝子型菌としての扱いが不可能なことが抵抗性の遺伝解析を困難にしており、今後、単孢子分離菌の利用について検討を行うなど、より単純な実験系の下で病原菌－抵抗性の相互作用を明らかにしていく必要がある。

第3章 倍加半数体系統を利用したハクサイの遺伝子連鎖地図の作成

近年、育種の効率化を図るために、種々の作物で DNA マーカーの利用が検討されており、アブラナ科植物においても *B. oleracea*、*B. campestris* および *B. napus* 等で DNA マーカーを用いた遺伝子連鎖地図の作成が試みられている (Quiros ら, 1994)。多くは制限酵素切断断片長多型 (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism) を検出するゲノミック DNA クローンあるいは c DNA クローンがプローブとして用いられ、根こぶ病抵抗性 (Landry ら, 1992; Figdore ら, 1993; Grandclement & Thomas, 1996; Voorrips ら, 1997) や形態的特性および種子成分 (Teutonico & Osborn, 1994; Uzunova ら, 1995) などと関連づけたマッピングもなされている。遺伝解析を円滑に進め、連鎖地図を効率的かつ確実に作成するためには、遺伝的に固定した材料を用いることが必須要件であり、遺伝子マッピングでの倍加半数体の利用価値は大きい。

本章では薬培養により育成した根こぶ病抵抗性および球内着色性を有する倍加半数体系統を親系統として用い、これら有用形質との関連の中で RFLP マーカーによる遺伝子連鎖地図の作成を試みた。

第1節 実用形質の遺伝

材料および方法

薬培養により作出した根こぶ病抵抗性の T136-8 と罹病性で球内葉および花卉が橙黄色の Q-5 の両倍加半数体系統をそれぞれ母、父本に用いて両者の交雑を行い、 F_1 、 F_2 および BC_1 を育成した。1993～94 年に各世代における球内葉と花卉色を調べて橙黄着色性の遺伝解析を行った。また、1993 年、連鎖地図作成のための RFLP 解析用 F_2 集団の根こぶ病抵抗性検定をガラス温室内で実施した。検定菌には望月菌を用い、8 月下旬に菌密度を 3.0×10^5 /乾土 g に調製した病土に F_2 種子を播種し、1 カ月後に根こぶの着生状況を調査した。抵抗性の評価は前章の方法に従い、 F_2 個体ごとに発病評点を記録した。発病評点が 0、1、3 の個体を根部の病土を洗い落とした後、20cm 径のポット内の殺菌培土に植え出し、抽苔・開花後、花色を観察して橙黄着色性を評価するとともに、蕾授粉による自殖を行い、 F_3 を育成した。発病評点 3 の個体は、鉢上げ後根こぶの肥大に伴って葉が萎凋して枯死するものが多発したため、生存した抽苔株についてのみ F_3 を養成した。1994～95 年に個々の F_2 個体由来の F_3 について、各 15～30 個体を供試して上記と同様な条件で根こぶ病抵抗性検定を実施した。また F_3 の一部種子 (20～30 粒) を 1994 年 10 月に播種し、翌春、抽苔・開花した花の着色状況を観察した。 F_2 個体ごとに F_3 での根こぶ病抵抗性と橙黄着色性の分離を調べ、両形質について F_2 個体の遺伝子型を判定した。

結果

橙黄着色性は球内葉および花卉において明瞭に発現し（図9）、球内葉が着色する個体は花卉も橙黄色を呈した。各世代における花卉色での発現結果を表25に示した。F₁では橙黄着色個体の発生が全く認められず、F₂では非橙黄と橙黄が約3：1に分離した。BC₁においては×T136-8が全て非橙黄で、×Q-5が非橙黄66：橙黄52に分離した。

また、表26に示すように、RFLP解析用F₂集団で橙黄色を示した24個体は、その後代が全て橙黄色素を有し、橙黄着色性に関し遺伝的に固定していることが確認された。非橙黄色F₂個体由来の各F₃集団では、非橙黄個体のみ発生するもの（27集団）と非橙黄と橙黄が分離するもの（44集団）が認められた。

根こぶ病抵抗性については、表27に示すようにF₂での発病評点が0の個体に由来するF₃集団において、抵抗性個体（評点が0、1）のみ生ずる場合と抵抗性と罹病性個体（評点が2、3）が分離する場合が認められ、前者型の抵抗性発現を示すF₂個体は、主働抵抗性遺伝子に関しホモ、後者型についてはヘテロと判定された。ホモ、ヘテロ個体の比は約1：2であった。また発病評点が1のF₂個体に由来するF₃集団でも同様な抵抗性発現が認められ、F₂におけるホモ、ヘテロ個体の比は1：3であった。評点が3のF₂個体由来のF₃集団ではいずれの個体も罹病した。



図9 T136-8系統（左）とQ-5系統（右）の球内色

表 25 橙黄着色性の遺伝

世 代	花 色		χ^2	P
	非橙黄	橙黄		
T136-8 (P1)	38	0		
Q-5 (P2)	0	37		
F ₁ (P1×P2)	28	0		
F ₂	114	36	0.08	0.80 - 0.70
BC ₁ (×T136-8)	75	0		
BC ₁ (×Q-5)	66	52	1.66	0.20 - 0.10

表 26 F₃検定によるF₂個体の橙黄着色遺伝子の遺伝子型

F ₂ での 着色性	調査F ₂ 個体数	F ₃ での判定		
		非橙黄ホモ	ヘテロ	橙黄ホモ
非橙黄	71	27	44	0
橙 黄	24	0	0	24

表 27 F₃検定によるF₂個体の根こぶ病抵抗性主働遺伝子Aの遺伝子型

F ₂ での 発病評点	調査F ₂ 個体数	F ₃ での判定		
		A A	A a	aa
0	49	16	33	0
1	37	9	28	0
3	9	0	0	9

考察

球内葉の橙黄着色性は欧州の飼料用カブに由来する形質で（湊ら, 1988）、これまでのハクサイ品種にはない特性として評価されているが、同様な着色は花卉にも発生し、その発生状況から、両組織の着色は同一遺伝子の作用で生成する色素により生ずると判断された。F₁、F₂および BC₁ での着色状況から、橙黄着色性は単一の劣性遺伝子に支配される形質と考えられ、着色遺伝子を *o* とすると、F₃ で非橙黄個体のみが生じた F₂ 個体の遺伝子型は *oo*、橙黄と非橙黄が分離した F₂ 個体の遺伝子型は *Oo* と判定された。橙黄着色形質の単一遺伝子支配は、F₃ での着色発現からみた F₂ 個体群における非橙黄ホモ（*oo*）と非橙黄ヘテロ（*Oo*）の比が理論比の 1 : 2 に比較的近い値を示したことからも裏づけられる。

T136-8 系統の根こぶ病望月菌に対する抵抗性は、1 優性主働因子により支配されることが前章で示されたが、これを仮に A 遺伝子と想定すると、F₂ で発病評点が 0、1 の抵抗性個体の遺伝子型は AA または Aa と推定される。これら F₂ 個体の遺伝子型は F₃ での抵抗性発現状況で判定されたが、F₂ 個体群での AA と Aa の比は橙黄着色性と同様、理論比の 1 : 2 に近い値を示した。

第2節 RFLP マーカーの検索

材料および方法

[親系統植物体からの DNA の抽出]

親系統として選定した倍加半数体系統 T136-8 と Q-5 を供試し、CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) 法 (Murray & Thompson, 1980 ; Rogers & Bendich, 1985) により緑葉から全 DNA を抽出した (付録 1)。

[c DNA プロープの作成]

キャベツ品種 'De Montage' と野菜花き試験場育成ハクサイ系統との種間雑種にハクサイ根こぶ病抵抗性系統を 3 回戻し交雑して育成した HM3-3 系統の 1 個体の外葉展開期の根部組織より全 RNA を抽出し、調製した mRNA を基に cDNA (complementary DNA) を合成した (付録 2)。合成した c DNA 断片は DNA ライゲーションキット (宝酒造) を用いてプラスミド pUC18 の *Hinc* II サイトに連結挿入し、大腸菌 JM109 に導入した。アンピシリン、IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside) および X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) 添加培地で選抜した形質転換大腸菌を少量培養し、増殖した菌からアルカリ法によりプラスミドを回収した。増殖プラスミドの中で、挿入断片が約 400 塩基対 (bp) 以上のクローン (HC クローン) を選抜してプロープとして用いた。

[サザンハイブリダイゼーションによる RFLP プロープの検索]

親系統 T136-8 と Q-5 の植物体から抽出した DNA 各 5 μ g を *Bam* H I、*Eco* R I、*Hae* III、*Hind* III の 4 種類の制限酵素 (25 ユニット) で 37°C (*Bam* H I のみ 30°C)・20 時間処理し、

切断された DNA 試料はアガロースゲル電気泳動に供した。バッファーには TAE (40mM Tris-acetate pH8.0、1mM EDTA) を用い、ゲル濃度を 0.8% とし、40 V の定電圧で 8 時間泳動した。アガロースは SeaKem GTG (FMC 社) を使用した。泳動後、0.4N NaOH を用いたアルカリブロットニング (Reed & Mann, 1985) により、DNA をゲルからナイロンフィルター Hybond N + (Amersham 社) に転写した。80°C・2 時間のベーキングにより固定した転写フィルターは c DNA クローンとのハイブリダイゼーションに供した。

プローブとなる c DNA については、pUC18 の *Hinc* II サイトの両側に隣接する塩基配列と相補的な 15mer の 2 プライマーを用いて PCR (Polymerase Chain Reaction) を行い、増幅した挿入断片をフェノール-クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製して調製した。

プローブの標識およびハイブリダイゼーションは ECL システム (Amersham 社) を用いて、以下のような手順 (フィルターサイズ 40cm² の場合) で行った。プローブの標識については、まず増幅 c DNA クローンを滅菌水で 10ng/ μ l となるように調製し、その 10 μ l をチューブにとり 5 分間沸騰水中で加熱した後、氷中で急冷して 2 本鎖 DNA を 1 本鎖に変性した。軽く遠心した後、正電荷を帯びたパーオキシダーゼを含む標識試薬 10 μ l を加えて混合し、さらに 10 μ l のグルタルアルデヒド液を混合して、37°C・10 分の処理を行うことにより標識プローブを作成した。一方、ブロットニングフィルターは 10ml の ECL ハイブリダイゼーションバッファーに浸け、42°C で 3 時間振とうしてプレハイブリダイゼーションを行い、その後標識プローブを加えて、42°C で 1 晩振とう処理を続けた。ハイブリダイゼーション処理したフィルターは 55°C の 1 次洗浄バッファー (0.5 \times SSC、0.4% SDS) 80ml に浸漬し、軽く振とうして 10 分間・2 回の洗浄を行った後、室温下で 2 次洗浄バッファー (2 \times SSC) 80ml に浸けて 5 分間・2 回の洗浄をくり返した。洗浄後、フィルター表面を検出試薬 1 (過酸化水素水) および 2 (ルミノール) 各 5 ml を混合した液で覆い、1 分間処理した。液を切ったフィルターは直ちにラッピングフィルムに包み、暗室内でオートラジオグラフィー用フィルム Hyperfilm-ECL (Amersham 社) に 3 時間感光し、現像して出現したバンドパターンを調べて、両親系で異なるパターンを示す RFLP プローブを選抜した。

結果

pUC18 にクローニングしたハクサイ c DNA 665 クローンの大きさを調べ、400bp 以上の 286 クローンを選抜してプローブとして用いた。プローブによりハイブリダイゼーションバンドのパターンや濃淡に差異がみられ、スメアー状のものやシグナルが弱くバンドの検出が困難なものも少数認められた。プローブ標識方法の影響か、またハイブリダイゼーション後の洗浄強度が弱いためか、全体に検出バンド数が多く、コピー数の正確な判定が困難な場合が多かった。

供試プローブ中、いずれかの制限酵素において両親系統間で異なるバンドパターンを検出したものは 55 で、その出現率は 19.2% であった。制限酵素の種類により多型の出現頻度は異なり、*Eco*R I、*Hae* III、*Hind* III ではそれぞれ 12.2、10.5、11.2% とほぼ同程度の出現率

であったのに対し、*Bam*H I では3.6%と低かった（表28）。図10に両親間の多型パターンを示したが、55RFLPプローブのうち、1種類の制限酵素のみで多型を示したものは31で、残りの6、16、2プローブについては、それぞれ2、3、4種類の制限酵素で両親間の切断パターンが異なった。

プローブの大きさと多型の頻度については、大きなプローブほど RFLP 検出率が高い傾向がみられ、0.4～0.5Kb のプローブが 10%であったのに対し 0.7Kb 以上のプローブでは約 30%が多型を検出した（表29）。

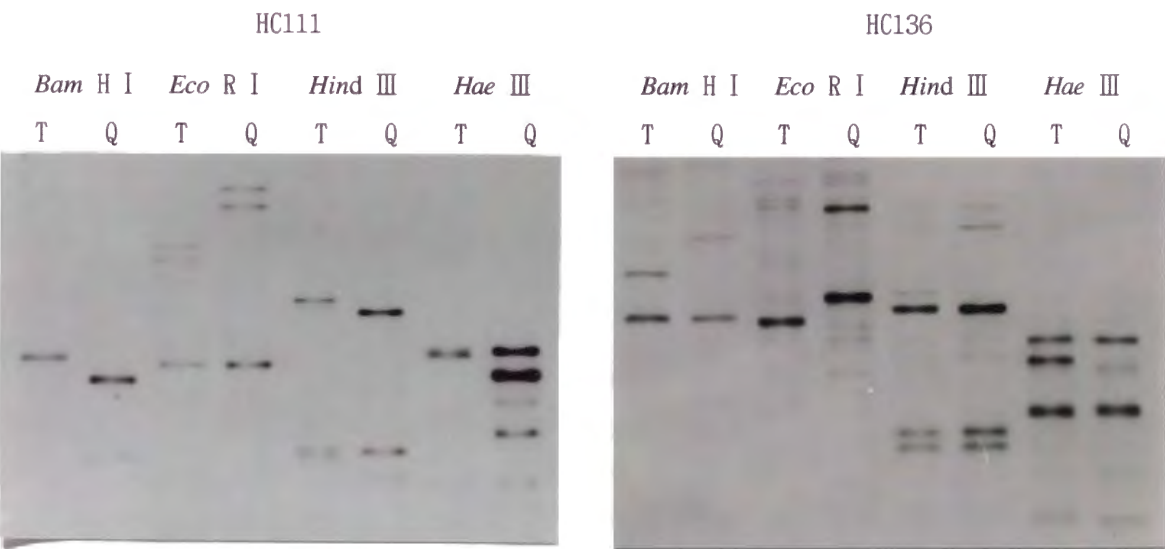


図10 両親系統間の RFLP パターン
 上段の T および Q は、それぞれ両親系統の T136-8 および Q-5 を示す

表 28 制限酵素の種類と RFLP の出現頻度				
制限酵素	認識塩基配列	供試プローブ数	RFLP を検出したプローブ数	RFLP 頻度 %
<i>Bam</i> H I	5' GGATTC 3'	223	8	3.6
<i>Eco</i> R I	GAATTC	286	35	12.2
<i>Hind</i> III	AAGCTT	286	30	10.5
<i>Hae</i> III	GGCC	286	32	11.2

表 29 プローブ (cDNA クローン) の大きさと RFLP の出現頻度

プローブの大きさ kb	供試プローブ数	RFLP を検出したプローブ数	RFLP 頻度 %
0.4 - 0.5	134	13	10
0.5 - 0.7	67	16	24
0.7 - 1.0	43	13	30
1.0 <	42	13	31

考察

Brassica 植物ゲノムにおける RFLP に関しては、他殖性を反映してか高率な多型の存在を示す報告が多い。Figdore ら (1988) は *B. campestris* および *B. oleracea* の広範な種類で比較検討を行い、種間、亜種間および品種間でそれぞれ 95、79 および 70% のランダムゲノム DNA プローブが多型を検出することを認め、近交系間でも高率な多型の出現を確認している。マッピングに用いる両親間の RFLP 頻度については、*B. campestris* (*B. rapa*) で McGrath & Quiros (1991)、Chyi ら (1992) および Teutonico & Osborn (1994) がそれぞれ 69、62.6 および 38.9~59.8% の比較的高率な多型の検出を報告している。また、*B. oleracea* (Kianian & Quiros, 1992) と *B. napus* (Landry ら, 1991; Ferreira ら, 1994; Uzunova ら, 1995) においても同レベルの多型が認められている。これら報告に比べて本実験での両親間の RFLP 頻度 (19.2%) は著しく低く、レタス (Landry ら, 1987b) やキュウリ (Kennard ら, 1994) での報告と同程度の多型出現率となっている。これは両親系統がともに抱合型の結球ハクサイであり、形状や生育特性が比較的類似するなど遺伝的に近い関係にあることを反映した結果と受けとめられる。

RFLP 頻度に影響を及ぼす要因としては、供試材料のほかにプローブおよび制限酵素の種類があげられる。通常、プローブとしては無作為にクローニングしたゲノム DNA あるいは mRNA を鋳型に合成した cDNA が用いられる。前者については DNA クローンライブラリーの作成は容易であるが、反復配列を多く含むため、プローブとして利用可能な少コピー数クローン獲得のためのスクリーニングが必要であるのに対し、後者は実際に発現する遺伝情報をコードしている遺伝子であり、ライブラリー作成は煩雑であるが、コピー数が比較的少ないため、プローブの前スクリーニングが不要であるなど、それぞれ長所、短所を有する。両プローブの RFLP 検出頻度についてはいくつかの作物で比較検討が行われ、cDNA プローブがランダムゲノム DNA プローブに比べてレタスでは 2.5 倍 (Landry ら, 1987a)、トマトでは 25~50% (Miller & Tanksley, 1990) 多く多型を検出したとする報告がなされている。これら報告を参考にして本実験ではキャベツとの種間交雑に由来するハクサイ系統の肥大生育根組織より抽出した mRNA 由来の cDNA をプローブとして使用した。

一方、ゲノム内で遺伝情報をコードする領域は保存性が強く、変異が生じにくいとされ、cDNA により検出される多型の多くはコード領域を挟む部位かイントロン領域の差異による

との見方もある (Miller & Tanksley, 1990)。大プローブは小プローブに比べて、コード領域のみならずその周辺のより広範な DNA 部位とハイブリダイズする確率が高いと考えられることから、大きい c DNA クローンにおいてより多くの多型が検出された本実験の結果は、この想定を支持するものと言える。

制限酵素については、4 種の酵素のうち、*Bam* H I を除き 10% をわずかに越える同程度の多型検出率を示した。*Bam* H I で RFLP 頻度が低かったのは、その認識配列部位において変異が少なかったためとも考えられるが、*B. napus* で *Bam* H I と *Eco* R I、*Hind* III が同等の多型出現率を示したとする結果 (Landry ら, 1991) を考えると必ずしも認識配列の相違だけでは説明できない。*Bam* H I で切断したゲノム DNA 断片は高分子側に偏る傾向にあり、バンドの分離が不十分で明確な多型として識別されなかったことも一因と考えられる。なお、マッピングに用いる制限酵素は、両親間での多型頻度が高い場合には Figdore ら (1988) が指摘するように 1 種類で十分であるが、本実験のように多型頻度の低い材料を供試する場合には数種類について検討する必要がある。

RFLP の生ずる原因として、制限酵素認識部位における塩基の置換あるいは認識部位周辺での挿入、欠失および転移等に基づく DNA 鎖の再配列が考えられる。4 塩基認識型の制限酵素による切断断片長多型頻度が 6 塩基認識型の酵素に比べて必ずしも高くなく、また同一プローブにおいて複数の制限酵素による切断断片が多型を示す傾向にあったとするレタス (Landry ら, 1987a)、イネ (McCouch ら, 1988) およびダイズ (Apuya ら, 1988) での報告は、RFLP の多くが DNA 鎖の再配列に起因することを示唆する。6 塩基認識型の *Eco* R I、*Hind* III と 4 塩基認識型の *Hae* III で同程度の多型がみられ、また 44% のプローブで複数の制限酵素による切断断片長多型が認められた本実験の結果は、ハクサイにおいても DNA 構造変異の多くが同様な機構により生じていることを示すものである。

第 3 節 遺伝子連鎖地図の作成

材料および方法

[遺伝子解析集団の育成と DNA 抽出]

遺伝子解析分離集団として T136-8 と Q-5 系統間の交雑の F_2 を用い、第 1 節で根こぶ病抵抗性および橙黄着色性の遺伝子型を F_3 で判定した 95 F_2 個体と根こぶ病抵抗性検定で発病評点 3 と判定された 9 F_2 個体の合計 104 個体を RFLP 解析に供した。植物体葉からの DNA 抽出は CTAB 法により行った。

[F_2 集団における RFLP クローンとのハイブリダイゼーション]

F_2 個体より抽出した DNA 各 5 μ g を制限酵素 *Bam* H I、*Eco* R I、*Hae* III、*Hind* III で切断処理して、アガロース電気泳動を行い、アルカリブロットティングにより DNA を泳動ゲルからナイロンフィルターに転写した。制限酵素処理、電気泳動およびブロットティングの方法は第 2

節に準じた。DNA を転写したフィルターは、第2節で選定した 53HC クローン（両親間で多型を示した 55HC クローンのうち、バンドシグナルが弱い2クローンを除く）とのハイブリダイゼーションに供した。ハイブリダイゼーションにはジゴキシゲニン（DIG）システム（Boehringer 社）を用いた（付録3）。

[連鎖解析および連鎖地図の作成]

RFLP マーカーおよび第1節で判定した根こぶ病抵抗性、橙黄着色性遺伝子型の F_2 での分離データを基に連鎖解析を行った。解析には遺伝子連鎖解析用コンピュータプログラム MAPL（鶴飼ら，1995）および MAPMAKER（Lander ら，1987）を用いた。まず F_2 での遺伝子型の分離比（1:2:1 または 1:3）の適合性を χ^2 検定により調べ、続いて連鎖の検定と組換え価の算出を行った。連鎖検定に際しては、最尤法による LOD（likelihood odds ratio）値が 3.0 以上の組合せを有意と判定した。連鎖解析結果に基づき、形質および RFLP マーカーの連鎖群への群分けを行い、同一連鎖群内での順序と連鎖距離を算定して遺伝子連鎖地図を作成した。連鎖距離は遺伝子間の干渉を考慮し、Kosambi（1944）の関数を用いて cM で表した。

[市販品種における RFLP マーカーの分離]

遺伝子地図上で根こぶ病抵抗性と近接連鎖する HC352、橙黄着色性と連鎖する HC173 をプローブに用いて、CR 歓呼ほか 26 F_1 品種、試交系統の RFLP 解析を行った。DNA 抽出、制限酵素処理、プロットングおよびハイブリダイゼーションは前述の方法に準じて行った。HC352 については *EcoR* I 切断の、HC173 については *Hae* III 切断のフィルターを用いてハイブリダイゼーションを実施した。

結果

両親系統が倍加半数体であるため、プローブとして用いた c DNA クローンによって検出された F_2 での多型バンドの分離パターンは明瞭で、個々の F_2 個体はいずれかの両親のバンドを有していた。53 c DNA クローン（HC クローン）による多型バンドの分離状態から 69 の遺伝子座が同定された。そのうち 52 の座は両親それぞれからの 1 対のバンドによる共優性型（1:2:1）の分離を示し、残りの 17 座は両親いずれか由来の 1 バンドの有無による優性型（3:1）の分離を示した。69 座のうち 13 座（19%）がメンデルの法則に基づく期待分離比から有為（ $p < 0.05$ ）に偏った分離を示した。これらの偏りは 7 座が T136-8 型の、また 5 座が Q-5 型の遺伝子型頻度が高いために生じたものであるが、1 座（HC166b）については分離比が 37:30:37 となり、ヘテロ接合体の頻度が低く、他とはやや様相を異にした。

F_2 での c DNA プローブによる多型バンドの分離はそのパターンによりいくつかのタイプに類別された（図 11）。40 プローブは 1 遺伝子座を決定する両親からの 1 対または 1 個の多型バンドを検出したが、そのうちの 22 プローブは多型バンド以外に両親系統に共通の 1 ～数個のバンド（単型バンド）を検出した。また 13 プローブは複数の遺伝子座を決定する数対（個）の多型バンドを検出し、うち 11 プローブでは更なる単型バンドの出現が認めら

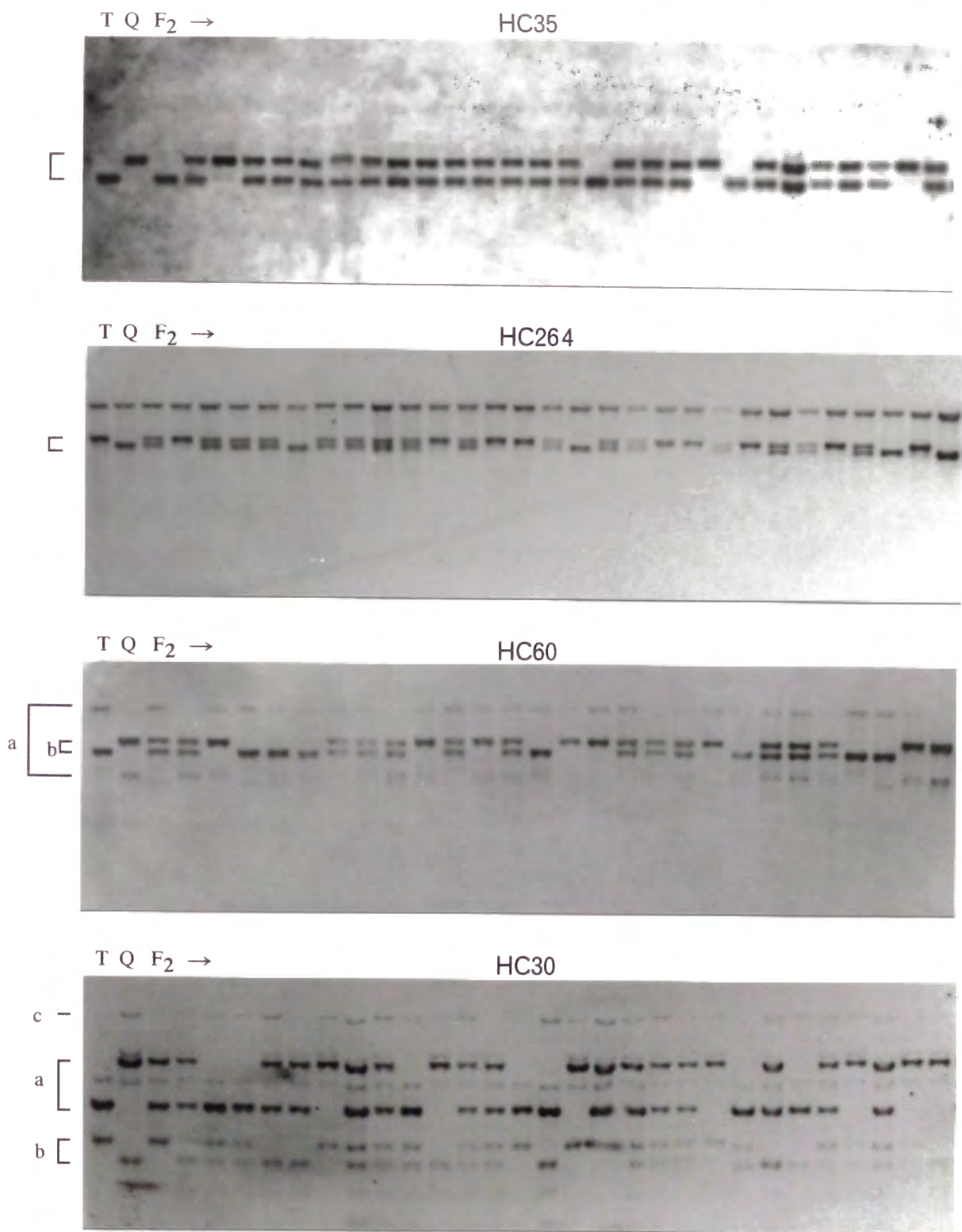


図11 RFLPクローンのF₂での分離パターン

T, Qは両親系統T136-8, Q-5の略

□ は共優性型の対立関係にあるバンドを示す

- は優性型バンドを示す

れた。

LOD 値と組換え価に基づく連鎖群分けにより 61 の RFLP マーカーと根こぶ病抵抗性および橙黄着色性の 2 形質座位が 10 の連鎖群に振り分けられた。8 RFLP マーカーはいずれの群とも連鎖関係になかった。各連鎖群はその地図上の距離の長さの順に 1 から 10 の番号を付した。図 12 に連鎖地図を示したが、その全長は 735cM で、隣接座位間の平均距離は 11.7cM であった。

重複遺伝子のいくつかは同一連鎖群内に位置し、HC646a,b は第 1 連鎖群に、HC62a,b および HC358b,c は第 2 連鎖群内でそれぞれ隣接して存在した。また HC30 と HC166 は第 1 (HC30b-HC166a)、第 5 (HC30a-HC166b) 連鎖群に両遺伝子の配列が保存された状態で存在した。

分離に偏りのみられた遺伝子座はいくつかの連鎖群に散在したが、第 6 連鎖群に属する 5 遺伝子座はすべて T136-8 側への偏りを示した。

根こぶ病抵抗性と橙黄着色性の 2 形質については、第 1 節の F_3 での抵抗性分離により判定した F_2 の遺伝子型に基づいて連鎖地図上の座位を決定した。根こぶ病抵抗性遺伝子 (A) 座 CRa は第 3 連鎖群の端部に近い部位に位置し、さらに端部側に RFLP マーカー HC352b および HC181 が 3、12cM 離れて近接連鎖した。根こぶ病抵抗性遺伝子座に最も近いマーカー HC352b は、Eco R I で切断した時に罹病性親 Q-5 系統に現れる 4.4kb バンドの有無により識別され、罹病性および抵抗性ヘテロ遺伝子型の個体は当該バンドを有し、抵抗性ホモの個体はバンドが欠如した (図 13)。

橙黄着色性遺伝子座 oy は第 1 連鎖群の末端に位置し、3 つの RFLP マーカー HC30b、HC173 および HC156 が 17~19cM 離れて隣接連鎖した。これら 3 マーカーは 1~2cM の範囲に近接し、橙黄着色性に対して同様な分離を示した。

遺伝子地図上で根こぶ病抵抗性および橙黄着色性と近接連鎖するクローン HC352b および HC173 をプローブとした 27 品種、試交系統の RFLP 解析結果を表 30 に示した。根こぶ病抵抗性連鎖優性型マーカー HC352b については、26 品種、系統が 4.4kb バンドを有し、'空海 65' のみが無バンドの抵抗性ホモ遺伝子型であった。橙黄着色性連鎖共優性型マーカー HC173 については、6 品種、系統が着色性ホモ遺伝子型で、橙黄着色の T638、オレンジクイーンおよびオレンジエースはいずれもこの中に含まれた。

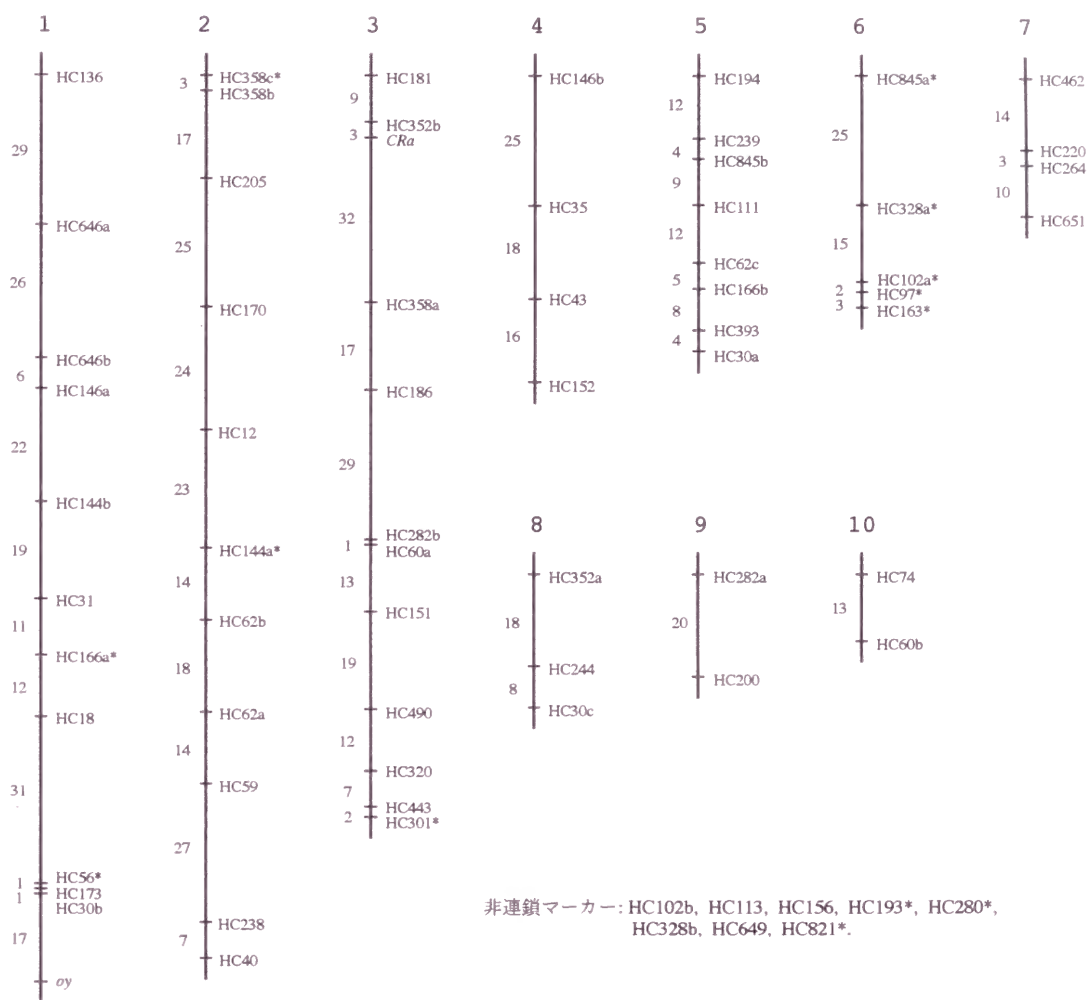


図12 ハクサイの遺伝子連鎖地図

遺伝子座名は各連鎖群の右側に、遺伝的距離 (cM) は左側に記載

同一プローブにより検出される重複遺伝子座は座名右に小文字アルファベットで示す

*: 分離に偏りのみられる ($p < 0.05$) 遺伝子座

表 30 ハクサイ品種と試交系統における根こぶ病抵抗性および橙黄着色性の表現型と RFLP マーカーの遺伝子型

品 種 系 統	根こぶ病* 抵 抗 性	橙 黄* 着色性	RFLP マーカ―**	
			352b	173
W002 (渡辺採種)	○	—	C	H
W003 (")	○	—	C	H
W2102 (")	○	—	C	H
W2158 (")	○	—	C	H
W3104 (")	○	—	C	B
信玄 (")	○	—	C	B
黄皇 65 (")	○	—	C	B
ほむら (")	○	—	C	H
CR9 (日本農林)	○	—	C	A
CR11 (")	○	—	C	H
CR12 (")	○	—	C	H
CR 歓喜 (")	○	—	C	H
CR 歓呼 (")	○	—	C	H
黄苑 (")	○	—	C	H
新理想 (")	—	—	C	H
KB509 (カネコ)	○	—	C	B
CR 先手 (")	○	—	C	H
福宝 60 (トーホク)	○	—	C	H
大福 (")	—	—	C	H
MSH13 (武蔵野)	—	—	C	A
空海 65 (タキイ)	○	—	A	H
T638 (")	—	○	C	A
オレンジクイーン (")	—	○	C	A
さくみどり 3 号 (")	—	—	C	H
CR 郷風 (サカタ)	○	—	C	H
S92-13 (")	—	—	C	A
オレンジエース (福 種)	—	○	C	A

品種、系統名後の () 内は育成種苗会社名

*○、—は根こぶ病抵抗性、球内橙黄着色性の有、無を示す

**根こぶ病抵抗性連鎖マーカー HC352b の遺伝子型 A: 抵抗性側 対 C: ヘテロ、罹病性側 対
橙黄着色性連鎖マーカー HC173 の遺伝子型 A: 着色性側 対 B: 非着色性側 対 H: ヘテロ



図 13 根こぶ病抵抗性連鎖 RFLP マーカー HC352b の F₂ での分離

上段の R, H, S は根こぶ病抵抗性の表現型 (F₃ での根こぶ病検定による)

R: 抵抗性ホモ H: ヘテロ S: 罹病性ホモ

考察

B. campestris (rapa) においてはこれまで両親を異にするいくつかの分離集団 (F₂ または F₃) を用いて RFLP マーカーを基にした遺伝子連鎖地図の作成が試みられている。Song ら (1991) はハクサイ品種 'Michihili' と Spring broccoli (*B. campestris* ssp. *utilis*) を、Chyi ら (1992) は異タイプのナタネ品種 'Horizon' および 'R500' を両親とする F₂ 集団を用いた連鎖解析により、それぞれ 1850cM (280RFLP マーカー) と 1876 map units (360RFLP マーカー) の 10 連鎖群から成る細密な連鎖地図を構築した。また McGrath & Quiros (1991) はカブとパクチョイとを両親に用いて 28RFLP マーカーと 3 アイソザイムマーカーから成る 262cM (8 連鎖群) の連鎖地図を作成している。さらに Teutonico & Osborn (1994) はナタネで 139RFLP マーカーと 3 形質 (毛茸、エルカ酸含量および種子色) を含む 11 連鎖群から成る 1785cM の連鎖地図作成を報告している。本実験で作成した連鎖地図の全長 (735cM) は、Song ら (1991)、Chyi ら (1992) および Teutonico & Osborn (1994) が報告した地図長のおよそ 40% で、隣接座位間の平均距離 (11.7cM) も前 2 者の約 2 倍とやや粗いものとなっている。これはマッピングマーカーの数が少ないことによるが、両親系統間の低 RFLP 頻度を反映した結果とも言える。連鎖群数は 10 でハクサイの基本ゲノム染色体数 ($n=10$) と一致した。しかし、マーカー数が少ないため基本ゲノムとの対応を明確にすることは困難で、マーカー数が増えれば一部連鎖群は他の連鎖群に結びつく可能性もある。

F₂ における遺伝子型の分離の偏りは、F₁ 個体が生殖細胞を作る過程での配偶子淘汰や生じた配偶子あるいは接合子の生存活力に起因し (Ferreira ら, 1994)、その程度は両親に用いる材料の遺伝的距離と密接に関係している (Chyi ら, 1992; Kianian & Quiros, 1992) と考

えられる。本実験で有為な偏りのみられた遺伝子座の頻度（19%）は、*B. campestris*のマッピングにおいて Chyi ら（1992）および Teutonico & Osborn（1994）が報告した頻度（それぞれ 24、23%）にやや及ばないが、Song ら（1991）および McGrath & Quiros（1991）の報告での頻度（それぞれ 3、12%）を上回った。両親系統が遺伝的に近いことを考慮すると、この偏りの頻度は高いと言える。また、*B. campestris*においては偏った分離を示す遺伝子座が特定の連鎖群の一定の部位に固まって位置し、これら遺伝子座の大半が両親の一方の遺伝子型に偏ったとする報告（Chyi ら、1992; McGrath & Quiros, 1991）もなされている。全体が片親側の対立遺伝子に偏る傾向は認められなかったが、第 6 連鎖群の 5 遺伝子座全てが母側の遺伝子型に偏ったここでの結果は、ハクサイにおいても異常分離が生じやすい部位がゲノム内に存在することを示唆するものである。アブラナ科他種で認められた同様な偏りを示す部位との関連性の解明は今後の課題であるが、遺伝子型頻度に影響を及ぼす染色体あるいは染色体部分の同定は、育種的観点からも興味深く重要と考えられる。

Brassica 属ゲノム内で遺伝子の重複が高頻度に生じていることは、*B. campestris* に関しての Song ら（1991）、McGrath & Quiros（1991）、Chyi ら（1992）および Teutonico & Osborn（1994）の、*B. oleracea* に関しての Slocum ら（1990）および Kianian & Quiros（1992）の、また *B. napus* に関しての Landry ら（1991）および Ferreira ら（1994）の報告から明らかであり、本実験においても同様に比較的高頻度（23%）の遺伝子の重複が認められた。高頻度の遺伝子重複はトウモロコシでも認められており（Helentjaris ら、1988）、その存在様態は染色体部分の相同性や遺伝子配列の状態等ゲノム構造に関わる情報を提供し、種の成り立ちを解明する上での重要な手がかりを与える。いくつかの遺伝子が連鎖群内に重複して存在し、また特定の遺伝子配列が保存された状態で重複した本実験の結果は、Slocum ら（1990）、Song ら（1991）および Chyi ら（1992）による遺伝子重複とゲノム構造に関する詳細な検討結果に通ずるもので、*Brassica* 属ゲノムがより少数の染色体を有する祖先種を起源に、染色体の重複や再配列等の構造変化を遂げながら進化したとするこれら報告での考察を支持するものである。

根こぶ病抵抗性親系統 T136-8 は、主働抵抗性 A 遺伝子のほか、1 乃至数個の抵抗性に関与する遺伝子を保有していると推察される。しかし、抵抗性検定に用いた根こぶ病望月菌に対しては、A 遺伝子の効果で抵抗性反応の多くを説明でき、 F_2 での遺伝子型の判定も確実に行えたため、その遺伝子座の正確な位置を把握することができた。

根こぶ病抵抗性 A 遺伝子座 (*C*Ra) は長さ 144cM の第 3 連鎖群の端部に近い位置に存在し、RFLP マーカー HC352b および HC181 が近接した。一方、やや複雑な遺伝様式をとる *B. oleracea* の根こぶ病抵抗性のマッピングにおいて、Landry ら（1992）、Figdore ら（1993）および Voorrips ら（1997）は QTL (Quantitative trait loci) 解析等を用いて複数の抵抗性遺伝子の地図上の位置を探索し、1 遺伝子が比較的長い連鎖群の端部に存在することを報告している。異ゲノムのハクサイで長い連鎖群の同様な位置に抵抗性遺伝子座を認めたことは興味深く、今後、これら異種抵抗性遺伝子間の関連性を明らかにする必要があるだろう。

抵抗性遺伝子座 *CRa* に最も近く 3 cM の距離で隣接した HC352b の座位は、*Eco* R I 切断による 4.4Kb バンドの有無による優性型の分離に基づいて決定された。対立遺伝子の一方のバンドが欠如して認識される優性型の分離は、対立遺伝子の片方のバンドが単型バンドと行動を共にする場合、両親のいずれかの当該遺伝子座において対立遺伝子が欠失したり挿入されるなど構造変化が起こった場合に生ずる (Song ら, 1991) と考えられる。ハクサイ 27F₁ 品種、系統中、1 根こぶ病抵抗性品種 ‘空海 65’ を除く 26 品種で 4.4Kb バンドが検出された結果は、このバンドがハクサイゲノム中に普遍的に存在することを示すもので、遺伝子座 HC352b は抵抗性親系統 T136-8 側の当該部位における欠失により説明される。唯一 4.4Kb バンドの存在が認められなかった品種 ‘空海 65’ が T136-8 系統と同じ根こぶ病抵抗性素材を利用して育成されたことを考え合わせると、この遺伝子座での欠失は抵抗性素材カブ ECD02 に由来すると推定される。HC352b は遺伝的に近い両親系統を用いてマッピングされた RFLP マーカーであることから、同一抵抗性素材を交雑親に用いた分離集団においては信頼できる選抜マーカーとしての利用が可能で、4.4Kb バンドを指標に抵抗性 A 遺伝子に関してホモの個体が効率的に選抜できると考えられる。

橙黄着色性については単一劣性遺伝子の支配による単純な遺伝様式をとるため、目的形質の選抜は容易である。しかし、その発現が結球期以後と遅く、着色個体を選抜するのに、時間と労力および広い場面積が必要で、また着色形質に関して遺伝子型がヘテロの個体の選抜は困難である。橙黄着色遺伝子座 *oy* に近接連鎖するマーカーの利用は、着色遺伝子を有する個体の確実な早期選抜を可能とする。橙黄着色遺伝子座 *oy* と 18cM の距離に連鎖した RFLP マーカー HC173 は、着色遺伝子をホモに保有する橙黄 F₁ 品種、系統を不完全ながら分別した。さらに近接連鎖する共優性型マーカーが見出せれば橙黄着色遺伝子を有する個体の選抜に十分利用できると思われる。

以上のように、倍加半数体系統を両親とする F₂ 集団での RFLP 解析に基づくマッピングにより、根こぶ病抵抗性と橙黄着色性の 2 実用形質遺伝子のハクサイゲノム内での位置が明らかとなった。様々な有用形質を複合的、有機的にとらえるために、今後、さらにマーカーの数を増やして連鎖地図の高密度化をはかる必要がある。

第4章 レタスにおける種間体細胞雑種の育成

キク科 *Lactuca* 属には100を越える多様な種が含まれるが、その中で唯一の栽培種である *L. sativa* (レタス) は野生種 *L. serriola*、*L. saligna* および *L. virosa* とともに $2n=18$ の特異的な近縁種群 ‘*serriola* グループ’ を成す (Thompson ら, 1941) 。 ‘*serriola* グループ’ 内4種の形態的、細胞学的特性については Lindqvist (1960a,b) の報告に詳述されており、それぞれの種が特徴ある形態と核型を有し、葉形や着色性等に関しての種内変異が存在することが示されている。

‘*serriola* グループ’ の3野生種は耐病虫性等の農業上有用な形質を有し、他のいくつかの近縁野生種とともにレタスの育種素材としても重要な位置づけがなされる (Ryder & Whitaker, 1976; Zohary, 1991) 。すなわち、ベト病 (*Bremia lactucae*) に対しては *L. serriola*、*L. saligna*、*L. virosa* が (Norwood ら, 1981)、ウドンコ病 (*Erysiphe cichoracearum*) に対しては *L. serriola*、*L. saligna*、*L. virosa*、*L. dentata* が (Lebeda, 1985)、キュウリモザイクウイルス (CMV) に対しては *L. saligna* が (Provvidenti ら, 1980)、またウワバ (*Trichoplusia ni* Hubner) に対しては *L. saligna* が (Whitaker ら, 1974)、葉アブラムシ (*Nasonovia ribis nigri*) に対しては *L. virosa* が (Eenink ら, 1982)、それぞれ抵抗性を有することが知られ、これら病害抵抗性育種の中で野生種利用の試みがなされている。

一方、わが国のレタス栽培は湿潤な気象条件下で行われるため、細菌による腐敗性病害が多発し、特に軟腐病 (*Erwinia carotovora*) および腐敗病 (*Pseudomonas cichorii*) は甚大な被害をもたらすことから、両病害に対する抵抗性品種育成への要望は強く、抵抗性の付与は重要な育種目標とされる。軟腐病と腐敗病に対しては *L. virosa* が強抵抗性を示すことが明らかにされており (塚田ら, 1987)、耐病性育種素材としての利用も検討されている。しかし、*L. sativa* と *L. virosa* とは遺伝的に離れた関係にある (Kesseli ら, 1991) ため、両種の交雑親和性は低く (Zohary, 1991)、例え雑種が得られても生育途中で枯死したり、不稔となる (Lindqvist, 1960a; Eenink ら, 1982) など、*L. virosa* の育種利用を図る上での障壁は多い。

本章では *L. virosa* の有する腐敗性病害抵抗性をレタスに導入するために、細胞融合法の適用を検討し、プロトプラスト作成から雑種個体再生に至る過程での一連の実験系に関して適条件の究明を行い、両種間の体細胞雑種の作出を試みた。

第1節 プロトプラストからの植物体再生

1 プロトプラストの作成

材料および方法

[酵素濃度の影響]

材料としてクリスプヘッドタイプ品種‘シナノグリーン’を供試した。殺菌（9%さらに粉液で5分殺菌後、滅菌水で3回すすぎ）種子をポリカーボネート製培養容器内のMS（Murashige & Skoog, 1962）寒天培地に無菌は種して、20℃、約2000lx・14時間照明下で培養し、は種1か月後に、生育した植物体本葉を摘出してプロトプラスト単離処理に供した。酵素はマセロザイム R-10 とセルラーゼ“オノヅカ”RS（ともにヤクルト本社）を用い、各0.1、0.2、0.4、0.6および0.8%の濃度で組合わせてCPW溶液（Frearsonら, 1973）に溶解した。酵素液は0.4M マンニトールにより浸透圧を調整し、0.22 μm のフィルターで濾過滅菌して使用した。各濃度区0.1gの植物体葉をメスで約1 mm幅に細断して3 mlの酵素液に浸漬し、25℃・暗黒下で18時間の酵素処理（静置）を行った。処理後、酵素液を80 μm のステンレスメッシュで濾過して未溶解の葉組織残渣を取り除いた。続いて濾液を10mlの遠心管に移し、150gで3分間の遠心分離を行ってプロトプラストを沈澱させた。上清の酵素液を除去した後、新たに0.4M マンニトール液を加えてプロトプラストを懸濁し、150g・3分の遠心分離を行った。同様な上清除去→マンニトールによる懸濁→遠心分離の操作をさらに2回繰り返し、プロトプラストを洗浄した。作成したプロトプラストは1 mlの0.4M マンニトールに懸濁し、トーマの血球計算盤を用いて密度を算定した。また、一部は後述のプロトプラスト培養用培地に密度が $1.0 \times 10^4/\text{ml}$ となるようにプレートして25℃・暗黒条件下で培養し、培養2週間後に分裂状態を調べた。細胞分裂の調査は倒立顕微鏡により行い、対物レンズ倍率10倍とした場合の1視野当たりの全細胞と分裂細胞の数を数え、分裂率を算定した（40視野の平均）。なお、実験は3回反復して実施した（以下のプロトプラスト作成実験も同様）。

[浸透圧の影響]

無菌は種1か月後の‘シナノグリーン’の植物体本葉（0.03～0.05g）を、マンニトール濃度を0.2～0.7Mとした4 mlの酵素液（0.4% マセロザイム R-10、0.4% セルラーゼ“オノヅカ”RSをCPW溶液に溶解）に浸け、25℃・暗黒下で18時間処理した。処理後、倒立顕微鏡にてプロトプラストの作成状況を観察し、球形で形状が安定している細胞を健全プロトプラストとみなして、血球計算盤上での数を基に収量を算定した。

[部位別収量]

無菌は種3、4日後に‘シナノグリーン’の胚軸および子葉を、1か月後に植物体本葉を、それぞれ摘出してメスで約1 mm幅に輪切り状（胚軸）あるいは短冊状（子葉、本葉）に細断し、4 mlの酵素液（0.4% マセロザイム R-10、0.4% セルラーゼ“オノヅカ”RSおよび0.4M マンニトールをCPW溶液に溶解）に浸け、25℃・暗黒下で18時間処理した。前述のステンレスメッシュでの濾過、3回の洗浄操作によりプロトプラストを精製し、収量を調べた。

結果

酵素処理葉片組織の溶解は酵素濃度が高いほど速く進行し、処理終了時には濃度 0.4% 以上の区で組織の大半が溶解した。洗浄後の濃度別プロトプラスト収量を表 31 に示したが、生葉 1 g 当たり $3.3\sim 6.0\times 10^6$ 個のプロトプラストが得られた。酵素濃度が高まるにつれてプロトプラスト収量は増加し、0.8% 区では 0.1% 区の 2 倍近くの収量が得られた。

酵素濃度別作成プロトプラストの初期培養培地での分裂率を表 32 に示した。0.1% 区が 3.4% の分裂率であったのに対し、0.2% 区では 1.2%、0.4% 区では 1.1% と、高濃度区ほど分裂が抑制された。0.8% 区では 0.1% 区の約 1/10 に相当する 0.3% の低分裂率であった。

酵素液浸透圧の影響を表 33 に示した。いずれのマニトール濃度においても球状プロトプラストが観察されたが、0.2、0.3M の低濃度区および 0.65、0.7M の高濃度区では細胞破損が著しく、原形質膜の状態も不安定であった。すなわち、低濃度区ではプロトプラストが膨張して張った状態の原形質膜の周辺に葉緑体が偏り、また高濃度区では細胞がコンパクトに締め、収縮変形する傾向がみられた。0.4～0.55M では破損細胞が少なく、形状も安定していた。

部位別のプロトプラスト収量に関して、胚軸では本葉、子葉の 1/2 以下と低く、安定したプロトプラストの作成が困難であった（表 34）。本葉、子葉プロトプラストの大半は多数の葉緑体を内包して充実し、緑色を呈したのに対し、胚軸プロトプラストは透明なものが多く、軽量であった。

表 31 プロトプラスト収量に及ぼす酵素濃度の影響

酵 素 濃 度 %		プロトプラスト収量 /g 葉重
マセロザイム R10	セルラーゼ RS	
0.1	0.1	3.3×10^6
0.2	0.2	3.9×10^6
0.4	0.4	4.1×10^6
0.6	0.6	4.4×10^6
0.8	0.8	6.0×10^6

表 32 プロトプラストの分裂に及ぼす酵素濃度の影響

酵 素 濃 度 %		分 裂 率
マセロザイム R10	セルラーゼ RS	%
0.1	0.1	3.4
0.2	0.2	1.2
0.4	0.4	1.1
0.6	0.6	0.9
0.8	0.8	0.3

表 33 プロトプラストの収量に及ぼすマンニトール濃度の影響

マンニトール濃度 M	プロトプラスト収量* /g 葉重
0.20	1.04×10^7
0.30	1.94×10^7
0.35	1.99×10^7
0.40	2.75×10^7
0.45	2.98×10^7
0.50	2.82×10^7
0.55	3.49×10^7
0.60	2.56×10^7
0.65	1.85×10^7
0.70	1.91×10^7

* 未精製収量

表 34 材料部位別プロトプラスト収量

供試部位	プロトプラスト収量 /g 葉重
本 葉	4.1×10^6
子 葉	4.3×10^6
胚 軸	1.9×10^6

考察

分裂能の高いプロトプラストを得るためには、材料の育成方法や供試部位、酵素の種類と濃度、酵素液の浸透圧などについての検討が必要とされる。プロトプラスト作成材料としては葉組織が用いられる場合が多く (Evans & Bravo, 1983)、レタスにおいても、Engler & Grogan (1982) はグロースチャンバー育成の植物体葉を用いて $3 \sim 4 \times 10^6$ /生葉重 g のプロトプラストを得、分裂誘起から植物体再生へと導いている。また、Berry ら (1982) は温室、グロースチャンバーあるいは無菌育成の植物体葉および無菌育成植物の根と子葉組織からプロトプラストを作成して各々の収量と分裂能を検討し、無菌育成葉と子葉でプロトプラスト収量が多く ($4.0 \sim 6.5 \times 10^6$ /生葉重 g)、分裂率も高いことを報告している。本実験では雑菌汚染および殺菌による細胞損傷等を考慮して無菌育成の植物体組織を用いたが、上記報告と同程度のプロトプラスト収量を得た。また、作成したプロトプラストは安定した分裂能を示した。

単離酵素として用いたマセロザイム R-10 とセルラーゼ“オノズカ”RS は、それぞれポリガラクトナーゼおよびセルラーゼを主成分とする。細胞壁と細胞間隙を構成するセルロース、ヘミセルロースあるいはペクチン物質を分解する両酵素の併用により、プロトプラストは比較的容易に作成できた。高濃度区ほどプロトプラスト収量は高い傾向がみられたが、分裂能は逆に低下した。これは酵素中に含まれる毒性を有する不純物質の影響による (Evans & Bravo, 1983) と推察され、収量性および分裂能を考慮した使用酵素濃度としては、両酵素とも 0.1% が適当と考えられた。

酵素溶液の浸透圧はプロトプラストの活性に影響を及ぼす重要な要因で、浸透圧が低い場合には吸水と膨張により細胞が破裂し、高い場合には原形質分離が起こるため、細胞内部の液圧とのバランスを保つよう設定する必要がある。浸透圧の調整には一般に糖や糖アルコールが用いられる。植物葉からのプロトプラスト単離には糖アルコールのマニトールが多く利用され、レタス類においても 0.4~0.7M の濃度で用いられている (Berry ら, 1982; Brown ら, 1987; Nishio ら, 1988; Matsumoto, 1991)。本実験では 0.40~0.55M の濃度で、球形で形状の安定したプロトプラストが得られた。浸透圧の細胞生理に及ぼす影響に関し、浸透圧が高い状態では細胞内へのアミノ酸の取り込みが阻害されたり (Ruesink, 1978)、細胞壁の再生が遅れる (Pearce & Cocking, 1973) ことが知られ、高浸透圧はプロトプラストの分裂および生育を抑制する一因と考えられる。従って、なるべく低浸透圧下でのプロトプラストの単離・培養が望ましく、安定したプロトプラストが得られる最低濃度の 0.4M (マニトール) を以下の実験に用いた。

2 プロトプラストの培養

(1) 初期培養

材料および方法

‘シナノグリーン’ と紅着色のリーフタイプ品種 ‘Lollo Rossa’ を供試して、プロトプラスト初期培養における生長調節物質の種類と濃度、培養密度および培地交換時期について検討した。プロトプラストは無菌は種 1 か月後の植物体葉を材料として、酵素 (0.1% マセロザイム R-10、0.1% セルラーゼ “オノズカ” RS および 0.4M マンニトールを CPW 溶液に溶解) 処理により単離した。処理時間・温度は、18 時間・25℃とした。単離プロトプラストは 0.4M マンニトールで 3 回洗浄した後、培養に供した。基本培地には、MS 培地の多量および微量成分濃度を 1/10 および 1/2 に下げた (NH_4NO_3 は欠く) 2 種類の培地 (A 培地、B 培地) (Engler & Grogan, 1982) を用い、液体培地上にプロトプラストを包埋したアガロース培地を浮遊させるアガロース・ビーズ法 (Shillito ら, 1983) により培養を行った。すなわち、0.5ml の A 液体培地に懸濁したプロトプラストを加熱融解後約 40℃に保温した 0.5ml の 1.5% 低融点アガロース (Sigma 社、Type VII) A 培地に所定密度になるように混合して径 6 cm の無菌プラスチックシャーレ底に広げて約 1 時間放置した。固化したアガロース培地を先の尖ったピンセットでセクター状に切断した後、4 ml の液体 B 培地を加えて浮遊させた。A、B 培地の組成は表 35 に示す通りである。

表 35 レタスプロトプラスト培養基本培地組成

成 分	A 培地	B 培地
多量無機養分 (NH_4NO_3 を除く)	1/10 MS (NH_4NO_3 を除く)	1/2 MS
微量無機養分	1/10 MS	1/2 MS
カゼイン加水分解物	100 mg/l	500 mg/l
ミオイノシトール	10	50
ニコチン酸	0.5	2.5
グリシン	0.2	1.0
葉酸	0.05	0.25
塩酸ピリドキシン	0.05	0.25
塩酸チアミン	0.05	0.25
ビオチン	0.005	0.025
ショ糖	0.3 M	0.3 M
コハク酸ナトリウム	1 mM	5 mM
アガロース	0.7 %	0
pH	6.0	6.0

生長調節物質に関する実験では、2,4-D (0.1、0.2mg/l)、NAA (0.1、0.2mg/l) および BA (0.4、0.5、0.7mg/l) を用い、それぞれ異なる濃度で組合せて A、B 培地に添加した。培養細胞密度は $1 \times 10^4/\text{ml}$ とした。プロトプラスト密度に関する実験は $1 \times 10^3 \sim 5 \times 10^5/\text{ml}$ の範囲の 6 水準で検討したが、A 培地には 0.1mg/l 2,4-D と 0.4mg/l BA を、B 培地には 0.2mg/l

NAA と 0.5mg/l BA を添加して培養を行った。また、培地更新に関する実験では、培養細胞密度を 1×10^4 および 1×10^5 /ml とし、液体 B 培地を 5、10 および 15 日後に更新して、分裂とコロニー形成に及ぼす影響を調べた。培地条件は密度実験に準じた。

培養温度・光条件は、25℃・暗黒とした。各実験（培地更新実験を除く）においてプレティング 2 週間後に細胞分裂率を、また 25 日後にコロニー（0.5mm 以上）形成数を調査した。なお、各実験は 3 回反復して実施した（以下の培養実験も同様）。

結果

アガロース培地に包埋したプロトプラストは、適条件下で培養 3～4 日後に 2 細胞に分裂した（図 14-A、B）。その後分裂を繰り返して多細胞化が進み、2 週間後には肉眼で観察可能なコロニー（小カルス）へと肥大生長した（図 14-C）。

培養密度を 1×10^4 /ml とした場合の培地添加生長調節物質の細胞分裂とコロニー形成に及ぼす影響を表 36 に示した。A 培地に関しては、0.1mg/l と同濃度に設定したオーキシシン 2 種（2,4-D、NAA）の効果に差がみられ、‘シナノグリーン’ および ‘Lollo Rossa’ とともに、2,4-D 添加培地で分裂率が高く、コロニー数も多かった。B 培地に関しては、‘シナノグリーン’ では NAA 0.2mg/l 添加が 0.1mg/l に比べて分裂促進効果が高く、0.2mg/l NAA と 0.5mg/l BA の組合せで分裂率が 14.7%、コロニー形成数が 63.0 とそれぞれ最も高い値を示した。一方 ‘Lollo Rossa’ では NAA と BA 濃度の上昇に伴って分裂が抑制される傾向がみられた。B 培地の NAA と BA 濃度を ‘シナノグリーン’ で最も分裂率が高い 0.2mg/l と 0.5mg/l に設定し、A 培地の 2,4-D および BA 濃度を変えた場合のプロトプラスト分裂の状況を表 37 に示した。A 培地添加両生長調節物質の効果は、上述の B 培地での結果と同様で、‘シナノグリーン’ では高濃度で分裂率が増加、‘Lollo Rossa’ では低下する傾向を認めた。

培養密度はプロトプラストの初期分裂とコロニー形成に大きな影響を及ぼした（表 38）。低密度区（ 1×10^3 /ml）では分裂（4 細胞以上）率が 1.5% と著しく低く、シャーレ当たりコロニー数は 1 以下であった。 5×10^3 /ml および 1×10^4 /ml 区ではともに分裂率が 9.2% と高く、コロニー数は、それぞれ 45.7、79.5 であった。培養日数が経過すると両区培地は淡黄色に変化した。 5×10^4 /ml 以上の密度では培地の黄化が著しく、 1×10^5 /ml および 5×10^5 /ml においては油状物質が液体培地表面に浮遊して細胞も黄変した。特に 5×10^5 /ml では、黄化の程度が最も強く、分裂細胞は存在するが途中で分裂が停止し、コロニー形成には至らなかった。コロニー形成数は 5×10^4 /ml 培地が 86.0 と最も多かった。培地 pH は密度の増加に伴って低下した。 1×10^5 /ml までは緩やかな低下であったが、 5×10^5 /ml では 4.42 と著しく低い pH 値を示した。

プロトプラストを一定密度以上で培養すると培地が黄化し、細胞分裂が妨げられる傾向が認められたため、液体 B 培地を更新した場合の分裂およびコロニー形成への影響について検討した。培地更新の効果は培養密度により異なる傾向を示し、 1×10^4 /ml では更新の有

効性は認められず、早期の更新は逆効果を及ぼした（表 39）。一方、 $1 \times 10^5/\text{ml}$ では培養初期（5 日後）の培地更新により分裂率とコロニー形成数が増加し、10 日後の更新においても対照の無更新に比べて高い分裂率を認めた。培地の黄化程度は分裂の旺盛な 5 日後更新区で大で、無更新区および 10 日後更新区がこれに次いだ。培地更新区の培地 pH は、いずれも無更新区に比べて高かった。

表 36 プロトプラストの分裂に及ぼす A および B 培地の生長調節物質の組合せ効果

品 種	A 添加物質 mg/l			B 添加物質 mg/l		分 裂 率 %			コロニー 形成数*
	2,4-D	NAA	BA	NAA	BA	—	2-4	4 細胞<	
シナク'リン	0.1	—	0.4	0.1	0.4	84.9	6.3	8.8	47.5
	0.1	—	0.4	0.2	0.5	78.0	7.3	14.7	67.5
	0.1	—	0.4	0.2	0.7	82.8	6.5	10.7	54.3
	—	0.1	0.4	0.1	0.4	88.6	4.9	6.5	36.3
	—	0.1	0.4	0.2	0.5	81.6	7.9	10.5	50.5
	—	0.1	0.4	0.2	0.7	82.2	6.6	11.2	55.2
Lollo Rossa	0.1	—	0.4	0.1	0.4	88.0	5.1	6.9	68.9
	0.1	—	0.4	0.2	0.5	88.4	6.2	5.4	53.8
	0.1	—	0.4	0.2	0.7	91.4	5.0	3.6	44.3
	—	0.1	0.4	0.1	0.4	89.7	4.0	6.3	56.8
	—	0.1	0.4	0.2	0.5	90.0	5.6	4.4	43.5
	—	0.1	0.4	0.2	0.7	91.5	4.4	4.1	29.1

* 1 シャーレ当たり形成数（以下の表についても同様）

表 37 プロトプラストの分裂に及ぼす A 培地生長調節物質の影響

品 種	生長調節物質 mg/l			分 裂 率 %			コロニー 形 成 数
	2,4-D	NAA	BA	—	2 - 4	4 細胞<	
シナク'リン	0.1	—	0.4	82.9	6.1	11.0	75.9
	0.2	—	0.7	81.5	6.5	12.0	85.7
	—	0.1	0.4	80.0	7.6	12.4	97.5
	—	0.2	0.7	80.1	6.5	13.4	108.5
Lollo Rossa	0.1	—	0.4	90.0	5.3	4.7	37.9
	0.2	—	0.7	91.5	5.2	3.3	29.4
	—	0.1	0.4	89.5	5.0	6.5	50.2
	—	0.2	0.7	92.1	4.2	3.4	22.2

B 培地には 0.2mg/l NAA および 0.5mg/l BA を添加

表 38 プロトプラストの分裂に及ぼす培養細胞密度の影響（‘シナノグリーン’）

プロトプラスト 密 度 /ml	分 裂 率 % (2 週間後)			コロニー 形 成 数	培 地* pH
	—	2 - 4	4 細胞<		
1 × 10 ³	95.3	3.3	1.5	0.8	5.81
5 × 10 ³	85.5	5.3	9.2	45.7	5.77
1 × 10 ⁴	86.2	4.6	9.2	79.5	5.72
5 × 10 ⁴	90.6	4.7	4.7	86.0	5.59
1 × 10 ⁵	94.2	3.6	2.2	48.0	5.52
5 × 10 ⁵	97.7	1.4	0.9	0.0	4.42

*培養 25 日後調査

表 39 プロトプラストの分裂に及ぼす液体 B 培地の交換時期の影響（‘シナノグリーン’）

プロトプラスト 密 度 /ml	交 換 時 期	分裂率 % (培養 18 日後)			コロニー 形 成 数	培 地* pH
		—	2 - 4	4 細胞<		
1 × 10 ⁴	無交換	88.2	4.7	7.2	36.0	5.63
	5 日後	90.0	3.9	6.2	26.0	5.72
	10 日後	89.2	4.6	6.3	38.0	5.71
	15 日後	90.8	3.3	6.0	29.8	5.77
1 × 10 ⁵	無交換	97.2	2.0	0.8	35.8	5.56
	5 日後	91.9	3.5	4.7	99.3	5.65
	10 日後	94.0	3.0	3.1	60.3	5.69
	15 日後	94.6	3.0	2.4	37.5	5.70

*培養 25 日後調査

考察

レタスのプロトプラスト培養に関しては、Berry ら（1982）、Engler & Grogan（1982）および Nishio ら（1988）の報告があるが、初期培養は液体あるいはビーズ培養法により行われ、プロトプラストの分裂とコロニー形成が導かれている。

液体培養に関して Berry ら（1982）は、プロトプラストが分裂の際に産生・放出する物質により培地と細胞が黄褐変し、コロニー生育が停止することを認め、さらに生育を持続するには浸透圧およびオーキシン濃度等を考慮した新たな培地の追加を頻繁に行う必要があるとしている。このように、細胞分裂の維持に培地組成の段階的変化を要する液体培養

は、培養手順が煩雑であり、簡易で効率的な方法とは言えない。

分裂阻害物質の拡散防止に固形培地の使用は有効で、Engler & Grogan (1982) および Nishio ら (1988) はそれぞれ固化剤のアガロースあるいはゲルライトにプロトプラストを包埋して培養するビーズ培養法を採っている。本研究では寒天培地上にプロトプラストを包埋したアガロース培地を重層する Engler & Grogan (1982) の方法を参考に、固形と液体両培地を併用したアガロース・ビーズ培養法を適用した。アガロース・ビーズ法はレタス野生種の *L. saligna* のプロトプラスト培養においても用いられ、分裂の持続とコロニー形成に有効なことが示されている (Brown ら, 1987)。一方、固化剤の種類によってプロトプラストの分裂、生育が異なることが知られ、Shillito ら (1983) は特定のアガロースがタバコやヒヨソのプロトプラスト培養に好結果をもたらすことを報告し、また Nishio ら (1988) はゲルライトがレタスプロトプラストにより適するとしている。ここで用いた低融点アガロース Type VII は Shillito ら (1983) の報告の中で比較的高い評価を得た固化剤で、各実験において安定した結果をもたらした。

レタスのプロトプラストの初期培養には、Kp8 (Kao, 1977)、KM8p (Kao & Michayluk, 1975) あるいは MS を基本とした培地が用いられる (Berry ら, 1982; Engler & Grogan, 1982)。ここでは Engler & Grogan (1982) による MS の構成要素を主体とする 2 種類の培地 (A、B 培地) を基本培地として用いた。A 培地 (アガロース) は MS 培地の多量および微量要素濃度を 1/10 に、B 培地 (液体) は 1/2 に下げた低無機塩濃度培地で、それぞれ多量要素中のアンモニウムイオンが除かれている。これはアンモニウムイオンがプロトプラストの分裂に阻害的に作用するとするバレイショ (Shepard & Totten, 1977) や *Salpiglossis sinuata* (Boyes ら, 1980) などでの結果を配慮して設定されたものと推察される。しかし、 NH_4NO_3 を 80mg/l 加えた B 培地 (Nishio ら, 1988) や 600mg/l 含む Kp8、KM8p 培地 (Berry ら, 1982; Brown ら, 1987) でレタスおよびその近縁種プロトプラストは安定した分裂を示すことから、レタスにおいてはアンモニウムイオンの分裂抑制効果は比較的高い濃度レベルまでは生じないものと考えられる。

緩衝剤としてコハク酸ナトリウムを含み、浸透圧調節にショ糖を用いている点もこの培地の特徴である。レタス細胞は特有の酸性物質を産生・放出するため、その影響で培地 pH の低下が生じ、コロニーの生育は停止する (Engler & Grogan, 1982)。コハク酸ナトリウムは緩衝作用を有し、細胞が放出する酸性物質による培地 pH 低下の緩和に寄与する。

一方、浸透圧の調節にはマンニトールやソルビトールが多く用いられるが、ショ糖はこれら糖アルコールと異なり、炭素源としても代謝利用される。従って、細胞分裂およびコロニー生育が進行する過程でのショ糖の消費に伴い、培地の浸透圧は徐々に低下する。このような浸透圧の漸次的低下はコロニーの生育に好影響を及ぼす (Berry ら, 1982) ほか、形成コロニーを浸透圧の低い茎葉分化培地に移す際の浸透圧ショックを和らげる (Shepard & Totten, 1975; Evans & Bravo, 1983) 効果もあると考えられる。

レタスプロトプラストの分裂誘起には生長調節物質の添加が必要で、オーキシシン (NAA、

2,4-D)とサイトカイニン(BA)が組合せて用いられる(Berryら,1982; Engler & Grogan, 1982)。本実験ではこれら物質について、既報の濃度レベルを中心に添加効果を比較検討したが、オーキシシンとサイトカイニンの濃度が上がると‘シナノグリーン’では分裂が促進されるのに対し、‘Lollo Rossa’では逆に抑制され、その効果に品種間差が認められた。また、初期培養培地の生長調節物質濃度は、コロニーの生育のみならずp-カルスの茎葉分化率にも影響を及ぼした。Berryら(1982)はオーキシシンレベルの段階的低下がコロニーの増殖に有効であるとし、Engler & Grogan(1982)はレタス細胞が培地中に放出する内生オーキシシンが、後の形態形成に影響を及ぼすとするなど、特に初期培養でのオーキシシンの効果の重要性を指摘している。2品種の培地反応や移植後のp-カルスからの茎葉分化率等を考量すると、ここで用いたオーキシシン濃度(0.1、0.2mg/l)は、レタスプロトプラストの培養に適するレベルにあると思われる。他方、Nishioら(1988)は比較的高濃度のオーキシシン(1mg/lの2,4-DまたはNAA)の初期培養培地への添加が高い茎葉分化率をもたらすことを報告しており、用いる材料、培養方法および培養密度によりオーキシシンの効果は異なると考えられる。

培地中の細胞密度はプロトプラストの分裂と形態形成に関与する重要な要因である。Engler & Grogan(1982)およびNishioら(1988)の報告と同様、本実験においても高密度培養で培地の黄変とpHの低下を伴う分裂抑制が生じ、また高密度培養により形成されたカルスは茎葉分化率が低かった。前述のように、レタス細胞の産生物には特有の酸性物質やオーキシシンが含まれていると推定され、高密度培養ではこれらが培地中に多量に蓄積されることから、コロニーの生育が抑制され、茎葉分化にもその影響が及ぶものと考えられる。従って、適培養密度は、初期分裂およびコロニー生育状況と後の茎葉分化率を考慮して決定する必要があり、アガロース・ビーズ培養を用いた本実験の結果からは $1 \times 10^4/\text{ml}$ が適密度と判断された。同じアガロース・ビーズ培養法を適用した野生種*L. saligna*での葉肉プロトプラスト培養では、 $1.25 \times 10^4/\text{ml}$ の密度で最高のコロニー形成率を得ており(Brownら,1987)、またゲルライトによるビーズ培養では、やや密度の高い $2.5 \times 10^4/\text{ml}$ が用いられている(Nishioら,1988)。

アガロース・ビーズ法での高密度培養による分裂抑制は、液体培地を更新することにより緩和できた。培養5日後の培地更新の効果が高かったここでの結果は、分裂阻害物質が比較的早期から培地中に蓄積されていることを示唆する。

(2) 再分化培養

材料および方法

‘シナノグリーン’と‘Lollo Rossa’の葉肉プロトプラストを、0.1mg/l 2,4-Dと0.4mg/l BAを添加したA培地に0.2mg/l NAAと0.5mg/l BAを添加したB培地を組合せたアガロース・

ビーズ培地で培養し（培養密度： $1 \times 10^4/\text{ml}$ ）、プレーティング3週間後に形成された小カルス（0.5mm以上）を、2,4-D（0.01、0.1mg/l）、NAA（0.01、0.1、0.2、0.4mg/l）およびBA（0.1、0.2、0.4mg/l）を含む径9 cmのプラスチックシャーレ中のLS寒天培地（ショ糖3%）に移植した。移植1か月後に茎葉分化と発根状況を調査した。また、異なる生長調節物質濃度培地で形成された初期培養カルスを0.1mg/l NAAと0.2mg/l BAを添加したLS培地に移植し、初期培養培地の生長調節物質が再分化に及ぼす影響を調べた。さらに、プロトプラスト密度を 1×10^4 および $1 \times 10^5/\text{ml}$ とした初期培養培地（上述のアガロース・ビーズ培地と同様な生長調節物質組成）に形成された‘シナノグリーン’のカルスを0.1mg/l NAAと0.2mg/l BAを添加したLS培地に移植し、初期培養の細胞密度が再分化に及ぼす影響を検討した。培養は全て23℃、2000lx・14時間照明下で行った。

結果

再分化培地におけるプロトプラスト由来カルス（以下p-カルス）の生育、発根および茎葉分化の状況を表40に示した。いずれの培地においてもp-カルスの肥大発育は認められたが、その生育量と性状、再分化率は生長調節物質の種類と濃度により異なった。また品種間で培地反応に差異が認められた。

‘シナノグリーン’においては、p-カルスはオーキシン低濃度で白（2,4-D）あるいは緑・黄白色（NAA）の軟らかい性状を呈し、肥大が促進されたのに対して、高濃度では黄褐変色し、生育が抑制される傾向が認められた。p-カルスからの茎葉分化は再分化培地移植1週間後頃よりみられ（図14-D）、形成された茎葉は、LS培地に移植することで発根して植物体へと成育した（図14-E）。茎葉分化に関しては、生長調節物質の影響が強く認められた。2,4-DとBAを組合せた培地では、2,4-Dの濃度効果が顕著に現れ、0.01mg/l区が8.4%の分化率を示したのに対し、0.1mg/l区では茎葉形成が全くみられなかった。一方、NAAとBAを組合せた培地では、NAA 0.1mg/l、BA 0.2mg/l添加区が11.0%の最も高い茎葉分化率を示し、その前後の濃度範囲で両物質濃度が上下すると分化率が低下する傾向が認められた。発根はいずれの培地においても観察されたが、NAA 0.01mg/lとBA 0.1mg/lを組合せた培地では根の発生が少なかった。

‘Lollo Rossa’におけるp-カルスの肥大生育は、NAA 0.01mg/lとBA 0.1mg/lを添加した区がやや劣るほかは、各区で大差なかった。発育カルスは黄～黄褐色を呈し、紅色素を有するものも観察された。茎葉分化は生長調節物質濃度が低い培地で促進される傾向がみられ、2,4-D 0.01mg/lとBA 0.1mg/lおよびNAA 0.01、0.1mg/lとBA 0.1、0.2mg/lを組合せた培地で20%前後の高い茎葉分化率が認められた。発根については、NAAとBAの低濃度組合せ区で抑制された。

茎葉分化に及ぼす初期培養培地生長調節物質の影響を表41に示した。‘シナノグリーン’、‘Lollo Rossa’ともに、A培地に2,4-D 0.1mg/lとBA 0.4mg/lを添加した場合、B培地のNAAとBAの濃度が上がるにつれ、茎葉分化率は高まる傾向がみられた。A培地にNAA

と BA を添加した場合には、B 培地の両物質の濃度効果は明らかでなかった。

初期培養時のプロトプラスト密度は、p-カルスの発育と茎葉分化に影響を与えた（表 42）。カルスの性状に関しては密度間で差異がみられなかったが、生育量と茎葉分化率については、ともに $1 \times 10^4/\text{ml}$ 区が $1 \times 10^5/\text{ml}$ 区を上回った。

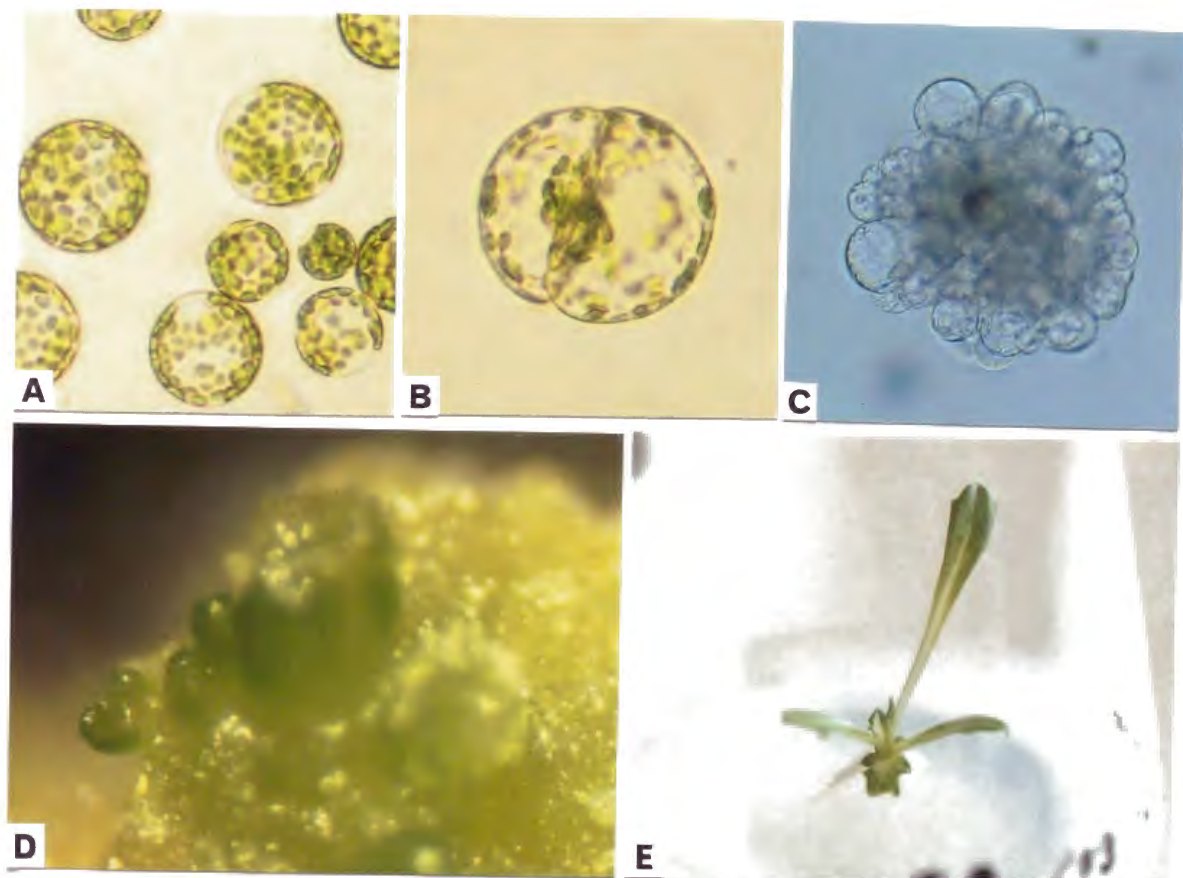


図14 レタス（‘シナノグリーン’）プロトプラストからの植物体再生

A: 単離プロトプラスト B: 第1分裂（培養4日後） C: コロニー形成（培養14日後）

D: プロトプラストカスからの茎葉分化 E: 再生幼植物体

表 40 茎葉分化に及ぼす再分化培地生長調節物質の影響

品 種	生長調節物質 mg/l			調 査 カス数	カスの大 きさ mm	発 根 個 数	茎葉分 化個数	茎 葉 分化率 %
	2,4-D	NAA	BA					
シナグリーン	0.01	—	0.1	203	8.3	31	17	8.4
	0.1	—	0.2	209	3.2	13	0	0
	—	0.01	0.1	208	7.7	2	14	6.7
	—	0.1	0.1	209	6.7	44	18	8.6
	—	0.1	0.2	210	6.9	48	23	11.0
	—	0.2	0.2	209	5.6	69	19	9.1
	—	0.2	0.4	209	5.5	70	18	8.6
	—	0.4	0.4	208	4.2	51	13	6.3
Lollo Rossa	0.01	—	0.1	158	5.9	39	31	19.6
	0.1	—	0.2	164	5.5	42	11	6.7
	—	0.01	0.1	157	3.7	1	31	19.7
	—	0.1	0.1	162	6.5	7	40	24.7
	—	0.1	0.2	161	5.3	0	38	23.6
	—	0.2	0.2	162	5.4	24	12	7.4
	—	0.2	0.4	163	5.8	44	28	17.2
	—	0.4	0.4	164	5.4	80	15	9.1

表 41 茎葉分化に及ぼす初期培養培地生長調節物質の影響

品 種	生長調節物質 mg/l (A 培地/B 培地)					調 査 カルス数	発 根 個 数	茎葉分 化個数	茎 葉 分化率 %
	2,4-D	NAA	BA /	NAA	BA				
シナグリーン	0.1	—	0.4	0.1	0.4	243	96	7	2.9
	0.1	—	0.4	0.2	0.5	559	189	34	6.1
	0.1	—	0.4	0.2	0.7	248	89	25	10.1
	0.2	—	0.7	0.2	0.5	312	93	24	7.7
	—	0.1	0.4	0.1	0.4	188	70	6	3.2
	—	0.1	0.4	0.2	0.5	539	244	40	7.4
	—	0.1	0.4	0.2	0.7	245	93	14	5.7
	—	0.2	0.7	0.2	0.5	356	179	19	5.3
Lollo Rossa	0.1	—	0.4	0.1	0.4	237	5	1	0.4
	0.1	—	0.4	0.2	0.5	317	15	25	7.9
	0.1	—	0.4	0.2	0.7	145	13	20	13.8
	0.2	—	0.7	0.2	0.5	224	0	30	13.4
	—	0.1	0.4	0.1	0.4	183	13	7	3.8
	—	0.1	0.4	0.2	0.5	317	24	30	9.5
	—	0.1	0.4	0.2	0.7	166	16	6	3.6
	—	0.2	0.7	0.2	0.5	140	20	18	12.9

表 42 茎葉分化に及ぼす初期培養時プロトプラスト培養密度の影響

プロトプラスト 密 度 /ml	調 査 カルス数	カルスの 大きさ mm	発 根 個 数	茎葉分化 個 数	茎葉分化 率 %
1 × 10 ⁴	230	7.1	59	18	7.8
1 × 10 ⁵	229	5.8	47	5	2.2

考察

p-カルスは先に述べたように、その前歴により再分化培地上で異なる形態形成反応を示す傾向があることから、植物体再生を効率的に導くには、初期培養と再分化培養を一体の系として捉える必要がある。本実験の初期培養条件下で形成されたカルスの茎葉分化には、オーキシシンとサイトカイニン両生長調節物質を添加した再分化培地の使用が有効で、初期培養と同様な濃度レベルの NAA (0.1mg/l) と BA (0.1、0.2mg/l) の組合せにより、安定的に茎葉分化が誘導された。同様に、Berry ら (1982) は NAA と BA を添加した初期培養および再分化培養培地を用いて茎葉分化を導いている。Engler & Grogan (1982) は初期培養に 2,4-D と BA を、再分化培養に 2,4-D とゼアチン²を組合せた培地を用いているが、茎葉発生の安定化には、初期培養でのオーキシシン濃度をプロトプラストの分裂誘起に必要な最低のレベルに設定することが望ましいとしている。また、BA のみ添加した培地で p-カルスからの高率な茎葉分化を認めた Nishio ら (1988) の報告は、高濃度オーキシシンの存在下で初期培養がなされる場合には、再分化培地へのオーキシシンの添加は不要なことを示すものである。

(3) 品種・種間差異

材料および方法

‘アルペン’、‘カルマー’、‘エンパイア’、‘エクシード’、‘GL659’、‘Lollo rossa’、‘オリンピア’、‘サリナス’、‘シスコ’、‘シナノグリーン’、‘ユニバース’ および ‘バンガード’ の 12 レタス (*Lactuca sativa*) 品種と近縁野生種の *L. serriola*、*L. saligna* および *L. virosa* (フランス国立植物遺伝資源研究所より導入) を供試し、初期分裂、コロニー形成および再分化の状況を調査した。プロトプラスト作成材料として、無菌は種 4～5 日後の展開子葉と 1 か月後の本葉を用い、0.1% マセロザイム R-10、0.1% セルラーゼ “オノズカ” RS および 0.4M マンニトールを含む酵素液での処理によりプロトプラストを単離した。初期培養は前述のアガロース・ビーズ法により行ったが、A 培地には 0.1mg/l 2,4-D と 0.4mg/l BA を、B 培地には 0.2mg/l NAA と 0.5mg/l BA を添加した。培養は 25℃・暗黒下で行い、2 週間後に細胞分裂、3 週間後にコロニー形成状態を調べた。培養 25 日後に、形成された小カルスを 0.1mg/l NAA と 0.2mg/l BA を添加した再分化用 LS 培地に移して、23℃、2000lx・14 時間照明下で培養し、移植 1 か月後に再分化状況を調査した。

結果

供試した 12 レタス品種と 3 野生種のプロトプラスト分裂率およびコロニー形成数を表 43 に示した。品種により、またプロトプラスト由来組織により分裂率の高低はみられたが、いずれの品種においても子葉および本葉由来のプロトプラストは分裂して多細胞となり、

表 43 レタス品種および野生種におけるプロトプラスト分裂率

種 類	プロトプラスト 採 取 部 位	分 裂 率 %	コロニー 形 成 数
アルペン	子 葉	6.6	13.0
	本 葉	4.5	36.6
カルマー	子 葉	4.1	25.8
	本 葉	2.3	15.0
エンパイア	子 葉	8.7	17.7
	本 葉	2.4	7.7
エクシード	子 葉	6.9	23.7
	本 葉	9.1	89.3
GL 659	子 葉	3.0	38.0
	本 葉	2.2	8.7
オリンピック	子 葉	7.1	36.1
	本 葉	2.5	11.0
サリナス	子 葉	2.5	11.5
	本 葉	4.9	26.3
シスコ	子 葉	8.5	95.4
	本 葉	12.2	127.3
シナノグリーン	子 葉	6.9	42.1
	本 葉	11.0	75.9
ユニバース	子 葉	6.4	63.8
	本 葉	4.9	35.9
バンガード	子 葉	15.3	172.8
	本 葉	4.9	65.9
Lollo Rossa	子 葉	3.8	29.9
	本 葉	11.6	93.8
<i>L. serriola</i>	本 葉	4.4	42.7
<i>L. saligna</i>	本 葉	4.0	15.6
<i>L. virosa</i>	本 葉	0.0	0.0

表 44 レタス品種および野生種プロトプラストカルの茎葉分化率

種 類	プロトプラスト		調 査	茎 葉	茎葉分化率
	採 取 部 位		カルス数	分 化 数	%
アルペン	子	葉	216	21	9.7
	本	葉	199	32	16.1
カルマー	子	葉	349	6	1.7
	本	葉	170	76	44.7
エンパイア	子	葉	114	8	7.0
	本	葉	146	29	19.9
エクシード	子	葉	142	23	16.2
	本	葉	227	31	13.7
GL 659	子	葉	124	2	1.6
	本	葉	170	43	25.3
オリンピック	子	葉	107	7	6.5
	本	葉	147	38	25.9
サリナス	子	葉	419	27	6.4
	本	葉	273	38	13.9
シスコ	子	葉	117	11	9.4
	本	葉	128	18	14.1
シナノグリーン	子	葉	121	9	7.4
	本	葉	249	21	8.4
ユニバース	子	葉	72	6	8.3
	本	葉	340	91	26.8
バンガード	子	葉	177	7	4.0
	本	葉	295	42	14.2
Lollo Rossa	子	葉	216	13	6.0
	本	葉	349	29	8.3
<i>L. serriola</i>	本	葉	450	49	10.9
<i>L. saligna</i>	本	葉	184	6	3.3

コロニー形成へと生育が進んだ。‘エンパイア’、‘バンガード’など7品種は子葉が、また‘Lollo Rossa’など5品種は本葉が分裂率が高く、特に、‘シスコ’、‘シナノグリーン’、‘Lollo Rossa’の本葉および‘バンガード’の子葉は10%以上の分裂率を示し、コロニー形成数も多かった。3野生種のうち、*L. serriola*と*L. saligna*はレタスと同程度の分裂率を示したが、*L. virosa*については全く分裂が認められなかった。

p-カルスからの茎葉分化に関しては、‘エクシード’を除く11品種で本葉プロトプラスト由来カルスが子葉由来カルスに比べて高い分化率を示した(表44)。特に‘カルマー’では、子葉p-カルスの茎葉分化率が1.7%であるのに対して本葉は44.7%と極めて高く、両組織由来カルス間で著しい分化能の差異が認められた。‘GL 659’、‘オリンピア’および‘ユニバース’についても本葉p-カルスが25%以上の高い茎葉分化率を示した。また、*L. serriola*は10.9%とレタス品種と同レベルの茎葉発生を認めたのに対し、*L. saligna*は3.3%とやや低い分化率であった。

考察

本実験で用いた培養方法は、様々なタイプのレタス品種および異種植物に適用可能で、野生種の*L. virosa*を除くすべての供試材料でプロトプラストから植物体を再生することができた。Engler & Grogan (1982) および Nishio ら (1988) も同様な組成の初期培養培地(固形)を用いた培養方法により、それぞれレタス9および8品種のプロトプラストから植物体再生を導いており、低濃度の改変MS初期培養培地を基本とする培養系がレタスプロトプラストの培養に汎用的に利用され得ることが示されている。

品種と供試部位によりプロトプラスト分裂率および茎葉分化に差異がみられたが、品種に関しては、概して‘バンガード’、‘シスコ’および‘シナノグリーン’のいわゆるバンガード系品種で分裂率が高く、コロニー形成数が多かった。品種‘クライマックス’が70%という著しく高い分裂率を示したとする報告(Engler & Grogan, 1982)と、‘バンガード’が片親に‘クライマックス’を利用して育成された品種であることを考え合わせると、‘バンガード’および‘バンガード’を素材とする品種の高い分裂能は‘クライマックス’に由来するものと推定される。

一方、p-カルスからの茎葉分化に関して、本実験では大半の品種において本葉プロトプラスト由来カルスが子葉由来カルスに比べて高い茎葉分化率を示した。これは、ここでの培養がEngler & Grogan (1982) による本葉プロトプラストの培養結果を基に設定された培地条件を用いてなされていることに起因すると思われる。また、初期培養培地への比較的高濃度のオーキシンの添加が子葉由来プロトプラストカルスからの茎葉分化率を高めたNishio ら (1988) の報告からは、本葉と子葉の両組織プロトプラストからの茎葉分化に対して、特に初期培養時の生長調節物質濃度が大きな影響を及ぼしていることがうかがわれる。

第2節 細胞融合による体細胞雑種の作出

1 プロトプラストの融合

材料および方法

材料として、レタス栽培品種‘シナノグリーン’と野生種 *L. virosa* (フランス国立植物遺伝資源研究所より導入) を供試し、無菌は種1か月後の両種の *in vitro* 育成植物体本葉から、酵素処理によりプロトプラストを作成した。酵素処理は0.4% マセロザイム R-10、0.4% セルラーゼ“オノズカ”RS および0.4M マンニトールをCPW溶液に溶解した酵素液を用いて、25℃下で18時間行った。単離プロトプラストは前節と同様、0.4M マンニトールで3回洗浄して精製した。作成した‘シナノグリーン’と *L. virosa* のプロトプラストを、それぞれ $1.5 \times 10^5/\text{ml}$ の密度に0.4M マンニトール液(0.1mM CaCl_2 を含む)で調整懸濁して等量混合し、直ちに融合処理に供した。融合処理は電気融合装置SSH-1(島津製作所)を用いた電気融合法により行った。融合チャンバーSSH-C03(同心円状平行ステンレス電極、電極間距離2mm)内の電極間溝にプロトプラスト懸濁液を滴下して2分間静置した後、まず高周波交流電圧を加えて細胞接触を導き、続いて直流高電圧方形波パルス電圧を印加して細胞融合を誘起した。交流電界強度は50、100および150V/cm(周波数1MHz)、直流電界強度は0.5、1.0、1.5、2.0および2.5KV/cmとし、それぞれの電界強度を組合せての処理を実施して(5回反復)、融合頻度および細胞損傷への影響を調べた。交流電圧は処理が終了するまで印加し続けたが、プロトプラストが数珠状(パールチェーン状)に接触した時点で直流パルス(方形波)電圧を1秒間隔で2回、各30 μ 秒間印加した。処理は全て室温条件下で行った。細胞融合の状態は倒立顕微鏡で観察し、1視野当たり(対物レンズ100 \times)の融合細胞および破損細胞の頻度を調査した。

結果

高周波交流電圧の印加によりプロトプラストは懸濁液中を泳動して、一定時間後に電極に垂直に連なって接触整列した。交流電界強度が高いほど細胞の泳動速度は早く、100V/cmでは約20秒、150V/cmでは約10秒で大半のプロトプラストがパールチェーン状に連なった。低電圧の50V/cmでは細胞の動きが鈍く、1分経過しても3~4割の細胞が連ならず液中に散在した。その後直流パルス電圧を加えるとプロトプラスト同士の接触部分から融合が始まり、時間の経過とともに融合細胞は徐々に合体し、3~5分後に1細胞となった。融合は2細胞間でなされる場合が多かったが、3細胞以上が合体する多細胞融合も観察された。

図15および16に異なる交流、直流電界強度を組合せて与えた場合の細胞融合率および細胞破損率を示した。細胞融合率は交流電界強度を50V/cmとした場合には、直流パルス電圧の上昇に伴って高まり、最大電界強度の2.5KV/cmで8.0%となった。交流電界強度が

100V/cm、150V/cmの場合には、直流電界が2KV/cmに融合のピークを生じ、それぞれ12.8%、26.4%の融合率を示した。このように細胞融合の発生頻度については、交流と直流の電界強度を強めた場合に高くなる傾向を認めたが、組合せる交流電圧の強度によって直流パルス電圧の効果は異なった。

一方、細胞損傷については、処理強度が強いほど大きなダメージが生じ、多くの破損細胞の発生が認められた。特に高直流電圧パルスの印加は細胞破壊の著しい増大をもたらし、2.5KV/cmの処理では、パルス電圧を加えた瞬間に破壊される細胞のほか、数秒～数十秒経過してから破損する融合細胞も観察された。

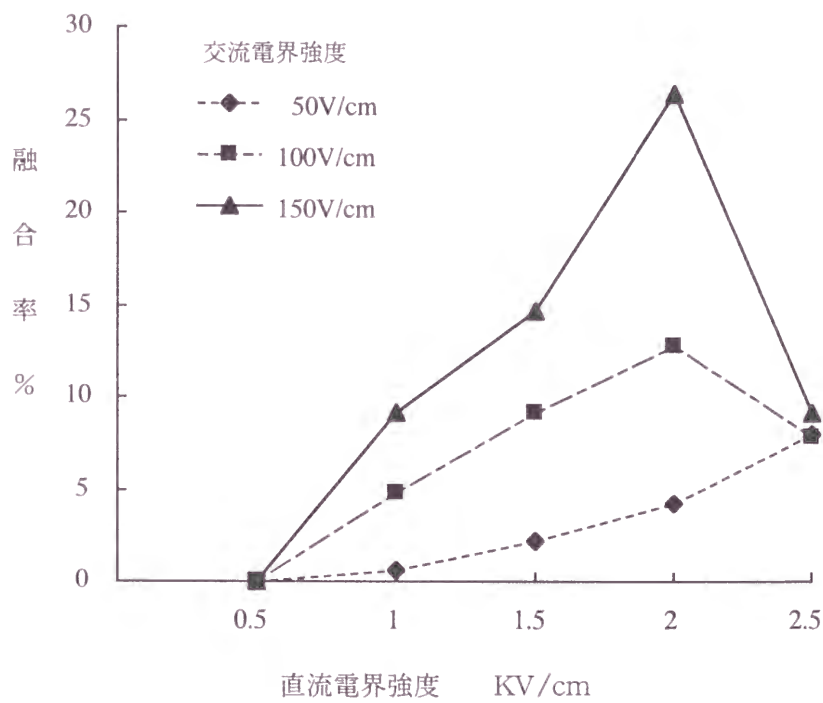


図15 細胞融合率に及ぼす交流および直流電界強度の影響

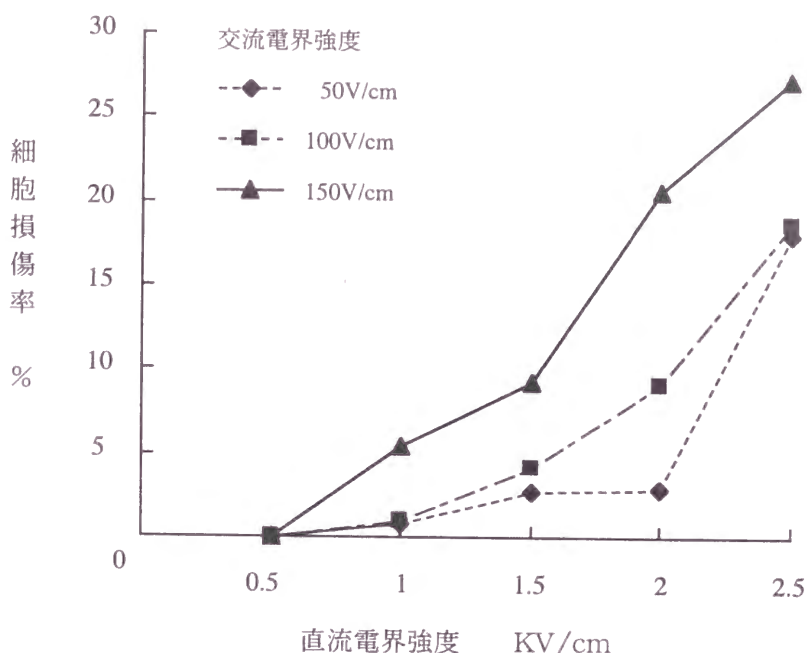


図16 細胞損傷に及ぼす交流および直流電界強度の影響

考察

植物細胞の融合法としては高分子化学物質のポリエチレングリコールによる方法（PEG法）と電気刺激による方法（電気融合法）が広く用いられる。特に電気融合法は、操作が簡単で処理が短時間で完了すること、技術的に安定していて再現性が高いことおよび大量融合を可能とすることなどから近年多用され、様々な植物種間での体細胞雑種の作出に寄与している。

電気融合の発生メカニズムに関しては、Gaynor（1986）やSowers（1992）の総説がある。それによると、まず、第1段階で高周波交流電圧を電極間のプロトプラスト懸濁液に加えると、電界に沿うプロトプラストの両側面が逆の電荷を帯びて細胞内での分極化が生じ、その影響で細胞間にクーロン力が働いて細胞同士は引き寄せ合い、プロトプラストは懸濁液中を動いて互いに接近、整列する。この時点で第2段階の直流高電圧パルスを印加すると、プロトプラスト同士が接触する部分を中心に、膜を構成している脂質層の分子配列に乱れが生じてプラズマレンマの破壊が発生する。時間の経過とともに、局部的に破壊された膜部分において脂質層は再構築されるが、接触部位の脂質層が繋がって熱エネルギー的に安定する球状化への方向で修復がなされた場合に細胞が一体化し、融合が生じる。

このように電気融合は細胞の接近と接触を導くための交流電圧印加と、細胞融合を誘起するための直流高電圧パルス印加の2段階の電気処理によりもたらされるが、植物細胞の電気融合処理は、多くの場合、交流電界を100~200V/cm(周波数0.5~1.5MHz)および直流電界を1KV/cm(印加時間10 μ 秒)~2KV/cm(同50 μ 秒)に設定した条件で行われる(Bates, 1992)。本実験では交流電界が50~150V/cmと直流電界が0.5~2.5KV/cm(30 μ 秒)の組合せで処理を実施したが、直流電界が2.0KV/cm以下では交流、直流ともに処理強度が強いほど融合率が高い傾向を認めた。交流電界は細胞を接近させて接触・整列へと導くのみならず、細胞が接した後には接触部に圧力を加える作用性をも有することから、ここでの高交流電界における融合促進効果は、接触細胞数の増加と接触部分への圧力の増大に基づく(Gaynor, 1986)ものと推察される。一方、直流電界は電気融合を誘発する直接的な要素で、融合率はパルス電圧の印加強度(電界強度と印加時間)によって大きく影響される。パルス電圧を高め、印加時間を長くすると膜の破壊程度が増大するため、融合が生じやすくなる反面、細胞そのものが破損しやすい状態となる。従って、本実験結果のように、一定レベルまでは電圧が高まるにつれて融合頻度は上昇するが、それを越える強電界処理では強い膜破壊とそれに伴う高率の細胞破損が生じ、融合率は低下する。同様な傾向はHibiら(1988)のタバコでの融合実験でも認められている。パルス電圧に関しては融合率がピークを示す強度での処理が望ましく、本実験の条件下では1.5~2KV/cm(交流150V/cm)で印加するのがよいと思われる。

電気融合に関与する要因としては、電界強度のほかに、植物の種類やプロトプラストの由来、大きさ、細胞密度および細胞融合液の組成などがあげられる。来歴や大きさを異にするプロトプラストは適融合電界強度が異なる(Tempelarr & Jones, 1985; Tempelaarら, 1987; Mehrleら, 1990)ため、それらを組合せた融合処理では電界条件設定に一定の配慮が必要とされる。本実験で用いたレタスと野生種 *L. virosa* のプロトプラストは、葉肉組織由来であり、大きさや性状が類似していることから、融合に適する電界強度は同レベルにあると推定され、共通の適電界強度の適用によって両種間細胞の効率的な融合が図られるものと判断された。

細胞融合処理は2核性のヘテロカリオン(最終的には核が合体)細胞の作出を目的に行われるが、その前提となる2細胞間の融合に対しては細胞密度が大きな影響を及ぼす。高細胞密度での融合処理は融合細胞数の増加をもたらす一方で、高頻度の多細胞間融合を誘起する(Bates, 1992)ため、2核性ヘテロカリオン細胞の作出には不適とされる。Hibiら(1988)はタバコ葉肉プロトプラストを用いた融合実験で、密度が一定以上になると、2細胞融合率および多細胞融合を含む全体の融合率が低下することを示し、 2×10^5 /mlに2細胞融合率のピークを認めている。また、Gaynor(1986)は低密度(約 5×10^3 /ml)の異種プロトプラスト懸濁液を時間差をおいて融合チャンバーに入れて誘電電気泳動する方法がヘテロカリオン細胞の頻度を高めるのに有効であると報告している。本実験では処理密度を 1.5×10^5 /mlとしたが、電界強度によっては20%を越える融合率が得られ、多細胞融

合の頻度も比較的少ないことから、この条件はヘテロカリオン細胞作出のための適密度範囲にあると推定された。

融合液に添加することで電気融合を促進する数種物質の存在が知られ、中でも Ca^{2+} は融合促進効果が高く、細胞にダメージを与えない (Tempelaar ら, 1987; Nea & Bates, 1987) ことから、有効な融合促進物質として電気融合処理に多く用いられる。 Ca^{2+} による融合促進は、膜表面電荷の中和作用および膜の流動性の抑制作用を通じて生じる (Nea & Bates, 1987) と考えられるが、比較的低濃度での使用が効果的で、ニンジン、タバコでの電気融合では 0.1~0.5mM の処理で好結果がもたらされている (Nea & Bates, 1987; Hibi ら, 1988)。本実験では Hibi ら (1988) の報告の中で最も高い融合率を示した濃度の 0.1mM CaCl_2 を添加して融合処理を行い、良好な結果を得た。DMSO (dimethylsulfoxide)、ポリアミンおよびプロテアーゼについても融合促進効果を有するとの報告 (Ruzin & McCarthy, 1986; Nea & Bates, 1987) がなされているが、これら物質は Ca^{2+} に比べて効果が低く、細胞に悪影響を与えるため、広く利用されるには至っておらず、ここでもその適用は控えた。

2 雑種細胞の選抜

材料および方法

代謝相補性を利用して効率的に雑種細胞を選抜するために、2種の代謝不活化剤、ヨードアセトアミド (IOA) およびジエチルピロカーボネート (DEPC) の処理条件を検討した。IOA と DEPC は作用性の異なる代謝阻害剤で、IOA はタンパク質の-SH 基を置換し、DEPC はヒスチジン残基に結合することにより不活化作用を及ぼすとされる (Wallin & Savage, 1982)。

品種 ‘シナノグリーン’ を供試し、無菌は種 1 か月後の *in vitro* 育成植物体本葉から、酵素処理によりプロトプラストを作成した。酵素処理は前項と同様な方法で行い、単離したプロトプラストは 0.4M マンニトールで 3 回洗浄して精製し、IOA および DEPC 処理に供した。IOA については、濃度が 5、10、15、20、25、30mM となるように 0.4M マンニトール液で調製し、各濃度液にプロトプラストを懸濁して 4℃ で 15 分間処理を行った。また、温度の影響を調べるために、濃度を 5 および 10mM とし、各 4 および 20℃ 下で 15 分間処理を行った。DEPC については、微量の 99.5% エタノールに溶解した後、0.001、0.005、0.01 および 0.05% (v/v) となるように 0.4M マンニトール液で調製し、各濃度液にプロトプラストを懸濁して室温で 10 分間処理を行った。IOA および DEPC 処理を行ったプロトプラストは、0.4M マンニトールで 3 回洗浄した後、0.1mg/l 2,4-D と 0.4mg/l BA を添加したアガロース A 培地に包埋し、0.2mg/l NAA と 0.5mg/l BA を添加した B 液体培地に浮遊させるアガロース・ビーズ法で培養した。培養は 25℃・暗黒下で行い、1 日後に Fluorescein diacetate (FDA) 染色によって細胞活性を調べ、10 日後に細胞分裂の状態を調査した。

結果

I0A 処理により葉緑体など細胞内容物の凝集が生じ、細胞は変形して活性を失ったが、その程度は処理濃度に影響された。処理 1 日後の FDA 染色による活性細胞率、10 日後の細胞分裂の状況を表 45 に示した。処理濃度が高くなるにつれて I0A の不活化効果は顕著に現れ、処理 1 日後の活性細胞率に関して、15mM までは対照区の 1/2 以上であったのが、25、30mM では 1/10 以下と著しい低下を示した。時間の経過とともに活性を有する細胞の頻度は低下し、10mM 以上の濃度においては処理 10 日後の調査で分裂細胞の存在は認められなかった。処理温度に関しては、4℃ に比べて 20℃ での細胞の不活化程度が大きく、I0A の効果がより強く現れた（表 46）。

DEPC 処理においても I0A と同様な細胞の形態的変化が観察された。高濃度ほど細胞のダメージが大きく、0.05%以上の処理では大半の細胞が変形した。処理後の活性細胞率、細胞分裂の状況を表 47 に示した。処理 1 日後の活性細胞の頻度は 0.01%で急激に低下し、0.05%以上の濃度では全ての細胞が不活化された。10 日後の細胞分裂調査では、低濃度区で分裂細胞の存在が確認されたが、0.01%以上の濃度での分裂は認められなかった。

表 45 プロトプラストの活性と分裂能に及ぼす I0A 濃度の影響

I0A 濃度 mM	活性細胞率* %	分 裂**
0 (対照)	89.6 (100)	+
5	88.1 (98)	+
10	67.3 (75)	—
15	50.9 (57)	—
20	36.7 (41)	—
25	5.5 (6)	—
30	5.7 (6)	—

*処理 1 日後の活性細胞率 () 内は対照を 100 とした場合の数値

**処理 10 日後の分裂の有無 +:有 —:無

表 46 プロトプラストの活性に及ぼす I0A 濃度および処理温度の影響

I0A 濃度 mM	処理温度 ℃	活性細胞率* %
0 (対照)	—	86.0 (100)
5	4	73.3 (85)
5	20	52.1 (61)
10	4	55.9 (65)
10	20	20.9 (24)

*処理 1 日後の活性細胞率 () 内は対照を 100 とした場合の数値

表 47 プロトプラストの活性と分裂能に及ぼす DEPC 濃度の影響		
DEPC 濃度 % (v/v)	活性細胞率* %	分 裂**
0 (対照)	72.5 (100)	+
0.001	79.0 (109)	+
0.005	60.7 (84)	+
0.01	7.7 (11)	—
0.05	0 (0)	—
0.1	0 (0)	—

*、** 表 45 に同じ

考察

異種間での融合処理細胞の中には、異種細胞が融合したもののほかに、非融合のものおよび同種融合のものが混在するため、体細胞雑種の効率的育成を図るには、異種融合細胞のみを選択的に選抜する必要がある。

雑種細胞選抜法には、突然変異マーカーによる遺伝的相補性を利用する方法、培地反応特異性に基づく生理的相補性を利用する方法、マイクロマニピュレーター、セルソーター等を用いて機械的に選抜する方法および化学物質、放射線の代謝不活化作用を利用する方法があり、組合せる材料によっては2法が併用される場合もある (Gleba & Sytnik, 1984)。これら選抜法の多くは特定の遺伝的背景を持つ材料でのみ適用可能であったり、特殊な装置や熟練した技術が必要とされるなど、汎用性のある方法とは言い難く、適用範囲は限定される。

前節で明らかにされたように、本研究で用いた初期培養培地ではレタスプロトプラストが分裂可能であるのに対し、野生種 *L. virosa* プロトプラストは分裂できないことから、薬剤の代謝不活化作用を利用する方法により両種間の雑種細胞が効率的に選抜できるものと推察された。すなわち、代謝阻害剤により不活化したレタスプロトプラストと *L. virosa* プロトプラストを融合した場合、代謝相補性により活性を回復した雑種細胞のみが分裂できる状態になるため、形成されたコロニーはヘテロカリオン細胞由来である可能性が大きく、生育コロニーを茎葉分化、さらには個体再生へと導くことにより効率的に雑種植物が作出できると考えられた。

本実験で用いた代謝阻害剤の IOA と DEPC の不活化効果は、処理濃度の影響を強く受け、また濃度反応については植物種や由来組織により異なることが明らかにされている (Wallin & Savage, 1982)。不活化処理は一般に細胞の分裂能を完全に抑制する条件で行われるが、濃度設定に際しては、融合率や融合細胞の活性への影響についての配慮も必要

とされる。

IOA および同種化合物のヨードアセテートは取り扱いが容易で効果が安定していることから、*Nicotiana* (Medgyesy ら, 1980; Sidorov ら, 1981)、*Daucus* (Ichikawa ら, 1987)、*Brassica* (Terada ら, 1987; Barsby ら, 1987; Yamashita ら, 1989)、*Solanum* (Perl ら, 1990) および *Lycopersicon* (Bonnema & O'Connell, 1992) など様々な植物種の不活化選抜に利用されている。これら報告の多くは葉肉プロトプラストを対象としているが、処理濃度は 0.25~20mM と幅があり、処理時間・温度も一定していない。本実験結果から、レタス細胞の分裂を完全に抑制する閾濃度は 5 mM から 10mM の間にあるとみられたが、エスケープ細胞の発生 (Terada ら, 1987) を考慮すると、処理は完全不活化を可能とする閾レベルより高い濃度で行うのがよいと考えられた。Yamashita ら (1989) は *Brassica* の細胞融合において完全不活化濃度としての最低レベルよりやや高めの 20mM で処理を実施し、エスケープ細胞の発生が少なく、融合率や融合細胞の活性にも影響ないことを認めており、レタスにおいても同様な不活化レベルに相当する 15~20mM での処理が適当と推察された。

処理温度は細胞壁の再生を考慮して 0~4℃ に設定される場合が多い (Nehls, 1978; Terada ら, 1987; Niizeki ら, 1994; Okamura, 1994) が、室温処理でも体細胞雑種が得られている事例 (Ichikawa ら, 1987; Wang & Niizeki, 1994) もあり、必ずしも低温で処理する必要はないと考えられる。ただし、処理温度を上げた場合、本実験結果にもみられるように不活化効果が高まることから、細胞への害作用を防止するために、処理濃度を下げたり、処理時間を短くするなどの措置が必要となろう。

DEPC は溶液の状態では比較的短時間で活性が低下することおよび取り扱いがやや煩雑であることなどの理由で、不活化選抜への利用例が少ない。Nehls (1978) は 0.1% の濃度で DEPC 処理 (0℃、15 分間) を行った *Solanum nigrum* 葉肉プロトプラストと iodoacetate で不活化した *Petunia hybrida* 葉肉プロトプラストとの細胞融合を試み、異種代謝阻害剤の作用相補性を利用した雑種細胞選抜の可能性を示した。一方、Wallin & Savage (1982) はエンドウ、タバコ葉およびニンジン培養細胞由来の 3 種プロトプラストについて DEPC の濃度を変えて 20℃ で 30 分間の処理を行った結果、エンドウとタバコの葉肉プロトプラストは、処理 1 日後にそれぞれ 0.005 と 0.04% の濃度で完全致死に至ったのに対して、ニンジン培養細胞由来プロトプラストは 0.04% で半数以上、0.08% で約 3 割が生存し、プロトプラストの種類により感受性が著しく異なることを認めた。処理時間および処理温度が異なるため、これら報告と本実験で得られたレタスについての結果とを単純に比較することはできないが、レタス葉肉プロトプラストはタバコ葉肉プロトプラストと同レベルの DEPC 感受性を有するとみられ、生存閾濃度は 0.01~0.05% にあると推定された。細胞活性と分裂に及ぼす効果を考量すると、レタスプロトプラストにおける DEPC の処理濃度は 0.05~0.1% が適当と考えられた。

3 雑種細胞からの植物体再生

材料および方法

融合実験材料としてレタス (*Lactuca sativa*) 3 品種 ‘シナノグリーン’、‘Lollo Rossa’ および ‘カルマー MR’ と野生種 *L. virosa* を供試し、無菌は種約 1 か月後の *in vitro* 育成植物体本葉からプロトプラストを作成した。プロトプラストの単離と精製手順は本節・1 に準じた。作成したレタスのプロトプラストは直ちに 20mM の IOA 液 (0.4 M マンニトールで調製) に懸濁して、4℃ で 15 分の不活化処理を行った後、0.4M マンニトールで 3 回洗浄した。IOA 処理を行ったレタスプロトプラストと無処理の *L. virosa* プロトプラストは、それぞれ密度が約 $5 \times 10^5/\text{ml}$ となるよう 0.1mM CaCl_2 を含む 0.4 M マンニトール液で調製し、等量混合して電気融合処理に供した。融合処理は電気融合装置 SSH-1 と融合チャンバー SSH-C03 (電極間距離 2mm) および SSH-C04 (同 4mm) を用いて室温条件下で行った。プロトプラスト接触のための交流電界強度は 100V/cm (周波数 1MHz)、融合のための直流パルス強度は 2KV/cm (印加時間 30 μ 秒) とし、プロトプラストがパールチェーン状に連なった直後に 1 秒間隔で 2～4 回のパルス電圧印加を行った。電気融合処理後 2 時間静置した後、処理液を遠心管に移して 120 g・2 分の遠心分離を行ってプロトプラストを収集した。上澄み液除去後、前述のアガロース・ビーズ培養法に従い、液体 A 培地を加えて密度が $2 \times 10^4/\text{ml}$ となるようプロトプラスト液を調製し、その 0.5ml と約 40℃ に保温した 1.5% 低融点アガロース (Sigma 社、Type VII) A 培地 0.5ml を混合して径 6 cm の滅菌プラスチックシャーレ底に広げ、融合プロトプラストを固化、包埋した。アガロース A 培地に包埋したプロトプラストは液体 B 培地に浮遊させて、25℃・暗黒下で培養した。A、B 培地には生長調節物質の 2,4-D あるいは NAA と BA を異なる濃度組合せで添加した (表 48、49)。初期培養において形成された小カルス (0.5～2mm) は、LS 基本培地に 0.1mg/l NAA と 0.2mg/l BA を添加した茎葉分化培地に移植して 23℃、1000lx・14 時間照明下で培養し、カルスの発育と茎葉分化を促した。分化茎葉については、0.1mg/l BA 添加の LS 培地で発育を促した後、生長調節物質無添加 LS 培地に移して発根を導いた。

なお、レタス品種 ‘シナノグリーン’、‘Lollo Rossa’ および ‘カルマー MR’ と *L. virosa* との融合実験は、それぞれ 24 回、11 回および 4 回実施した。

結果

電気融合処理および雑種細胞選抜のための不活化処理は本節・1 および 2 で得られた結果に基づいて条件設定して実施したが、融合時の交流電界強度については、本節・1 で好結果を得た 150V/cm より低い 100V/cm とした。これは、細胞密度を $5 \times 10^5/\text{ml}$ とした影響で、150V/cm では細胞同士の接触がより速やかに進む反面、直後のパルス印加によって破損する細胞が多くみられたためである。

作成したプロトプラストの状態により融合頻度や融合時の細胞破損程度が異なり、概し

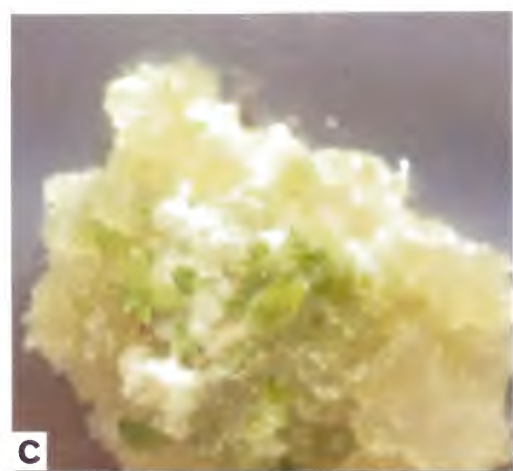
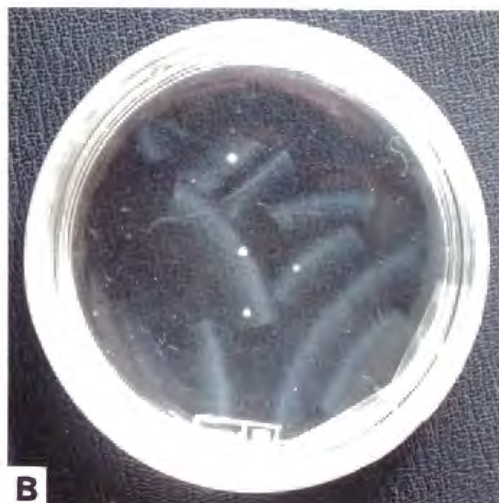
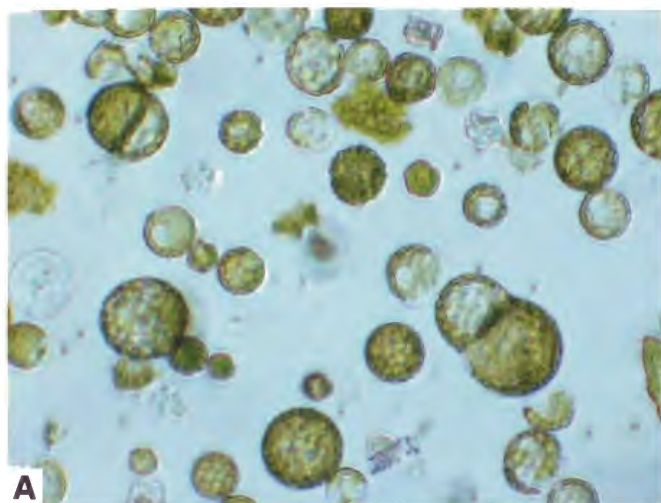


図17 レタス品種 'シナノグリーン' と *L. virosa* 間の雑種細胞からの植物体再生

- A: 融合細胞 B: 雑種 コロニー形成 C: 雑種カスからの茎葉発生
D: 体細胞雑種植物体

て融合が良好に行われた実験においてコロニー形成が多く認められた。‘シナノグリーン’、‘Lollo Rossa’ および ‘カルマー MR’ について、それぞれ 24、11、4 回の融合実験中、12、3 および 1 回の実験でコロニー形成が観察された。

電気融合により生じた雑種細胞（図 17-A）は、レタスのプロトプラスト培養用培地で分裂し、コロニーを形成した。初期培養培地でのコロニー（小カルス）形成は培養約 2 週間後より観察されたが、その数は 1 シャーレ当たり 1 ～ 数個の場合が多かった（図 17-B）。約 1 か月後に茎葉分化培地に移した小カルスの多くは発育・肥大し、一部で茎葉の発生を認めた（図 17-C）。また、茎葉分化培地で数回継代培養した後に茎葉を形成したカルスもあった。生育した茎葉は生長調節物質無添加の LS 培地に移したが、概ね 20 ～ 30 日後に発根し、完全な植物体となった（図 17-D）。

表 48 と 49 に ‘シナノグリーン’ あるいは ‘Lollo Rossa’ と *L. virosa* 間の融合実験で得たカルス数と茎葉分化数を培地別に示したが、それぞれ合計で 50 および 21 個のカルスを得、そのうち 16 および 6 カルスが茎葉を分化した。また ‘カルマー MR’ については、3 カルスを得、うち 1 カルスで茎葉分化を認めた。‘シナノグリーン’ あるいは ‘カルマー MR’ と *L. virosa* との組合せで得た植物体は、全て葉形・葉質等が両親種の間中型で、雑種個体と判断された。一方、‘Lollo Rossa’ と *L. virosa* 間の融合実験で得た 6 植物体のうち 4 個体は中間型の形態を示したことから雑種と判断されたが、2 個体は ‘Lollo Rossa’ に類似し、‘Lollo Rossa’ のエスケープ細胞由来とみられた。

茎葉分化に及ぼす初期培養培地の影響に関しては、総じて、オーキシンとして NAA を用いた培地が 2,4-D 添加培地に比べて高い茎葉分化率を示したが、形成カルス数が少ないため、濃度効果などについての詳細は明らかでなかった。

表 48 ‘シナノグリーン’ と *L. virosa* の細胞融合における初期培養培地別茎葉分化数

初期培養培地生長調節物質（A 培地/B 培地）mg/l						カルス形成		茎葉分化		
2,4-D	NAA	BA	/	2,4-D	NAA	BA	個	数	個	数
0.1	－	0.4		0.1	－	0.4	2		0	
0.1	－	0.4		－	0.2	0.7	26		6	
－	0.1	0.4		－	0.4	0.4	10		3	
－	0.2	0.5		－	0.2	0.5	6		3	
－	0.2	0.5		－	0.4	0.4	1		1	
－	0.2	0.5		－	0.2	0.7	4		2	
－	0.3	0.6		－	0.3	0.6	1		1	

表 49 ‘Lollo Rossa’ と *L. virosa* の細胞融合における初期培養培地別茎葉分化数

初期培養培地生長調節物質（A 培地/B 培地）mg/l						カルス形成		茎葉分化	
2,4-D	NAA	BA	/	NAA	BA	個	数	個	数
0.1	—	0.3		0.1	0.3	3		0	
0.1	—	0.4		0.2	0.7	14		4	
—	0.1	0.4		0.2	0.5	1		0	
—	0.2	0.4		0.2	0.4	1		1	
—	0.2	0.5		0.2	0.7	2		1	

考察

本節・2 で述べたように、代謝阻害剤 IOA で不活化したレタスのプロトプラストと分裂能を欠く *L. virosa* プロトプラストとの融合では、代謝相補作用によって雑種細胞のみが分裂できる状態となるため、初期培養培地上に形成されたコロニーは雑種細胞由来である可能性が大きい。実際、レタス 3 品種と *L. virosa* との融合実験で計 74 のコロニー（小カルス）を得、23 カルスから植物体再生を導いたが、そのうち 21 個体が形態的特徴から両種間の体細胞雑種と判断され、再生個体の 9 割以上が雑種という結果となった。同様な結果は IOA 処理キャベツ（*Brassica oleracea*）と茎葉再生能を欠くハクサイ・カブ類（*B. campestris*）との細胞融合においても報告されている（Terada ら, 1987；Yamashita ら, 1989）。このように、両親種の一方が分裂能や再生能を欠く場合の他方への代謝不活化処理は雑種細胞選抜効率が高く、特別な遺伝マーカーを持たない融合組合せにおいて体細胞雑種選抜のための有効な手法になり得るものと思われる。

選抜コロニーからの再生個体の中に、少数ではあるがレタスの形態を有するものが認められ、不活化処理レタスのエスケープ細胞由来と推察された。不活化親由来のエスケープ細胞の発生は *Brassica* でも認められているが、その発生原因として非不活化プロトプラストによる‘ナース効果（nurse effect）’が指摘されており（Terada ら, 1987）、レタスにおいても同様なプロトプラスト間の相互作用が関与している可能性は大きい。

雑種コロニーの形成に関しては、融合頻度および融合時の細胞破損程度およびそれに関わる作成プロトプラストの生理的・物理的安定性が大きく影響し、各実験においてこれら要因の変動がコロニー形成の成否を分けた。1～数個というシャーレ当たりのコロニー形成数は、レタスプロトプラスト単独培養時のコロニー形成数と融合頻度および電気刺激によるダメージ等を考え合わせると必ずしも少ない数とは言えない。しかし、雑種細胞の分裂能や分裂可能な細胞が極めて少ない培地中での雑種細胞と他細胞との相互作用および密度効果等の培養過程におけるコロニー形成要因の影響については不明な点が多く、今後、培養密度の改変やナースカルチャーの適用など、これら要因に関連した培養方法の改善によって雑種コロニー形成頻度を高めることも可能と考えられる。

茶葉分化に関しては、形成カルの約3割が茶葉を発生した。この頻度は第1節・2で得た‘シナノグリーン’と‘Lollo Rossa’それぞれのp カルの茶葉分化率に比べて高く、異種ゲノムの共存が再分化能の向上に結びつく形となった。雑種カルがより高い茶葉分化率を示すことは、トマト (*Lycopersicon esculentum*) と近縁種 *L. peruvianum* との融合組合せにおいても報告されており (Ratushnyak ら, 1994)、ヘテロシスの一つの現れとも受けとめられる。

第5章 レタスの体細胞雑種の一般特性、耐病性および染色体構成

細胞融合で作出したヘテロカリオン体細胞雑種は、一般に両親種の生理・形態的特徴を合わせ持つ。しかし染色体数やその構成内容は必ずしも一様ではなく、諸形質の表現型に差異がみられる場合も多い。本章では細胞融合により作出したレタスと *L. virosa* との種間体細胞雑種個体について、形態および稔性等の一般特性と腐敗性病害抵抗性を調べ、育種的利用を図るために、自殖および戻し交雑を行って後代育成を試みた。また、細胞学的観察により体細胞雑種および戻し交雑後代個体のゲノム構成を探った。

第1節 形態的特性および稔性

材料および方法

0.1mg/l NAA と 0.2mg/l BA を添加した LS 培地で数回植え継いだレタス品種 ‘シナノグリーン’、‘Lollo Rossa’ および ‘カルマー MR’ と野生種 *L. virosa* との体細胞雑種、それぞれ 16、3、1 クローン由来の幼植物体をプラスチック容器に詰めたバーミキュライトに植え出して、ガラス温室で 2～3 週間の順化を行った。鉢上げ後、活着した生育個体について、栄養生長過程で葉形、葉質および葉色等の葉形質を、開花時に花器の大きさと形態を調査した。稔性に関しては、開花時に柱頭における花粉粒付着状態を倒立顕微鏡で観察し、開花 1～2 か月後に自家受粉種子の着生状況を調査した。また、‘シナノグリーン’ と *L. virosa* の体細胞雑種個体を母本として ‘シナノグリーン’ の花粉を授粉し、戻し交雑種子の獲得を試みた。戻し交雑により得た種子は MS 培地に無菌は種し、発芽・生育した戻し交雑 (BC_1) 幼植物体についてガラス温室内で順化・鉢上げを行い、形態的特性を調査した。また、開花時にその稔性を調べ、自家受粉およびレタス育成系統の花粉を授粉して後代種子の獲得を試みた。さらに、前章で確立した培養系を用いて BC_1 個体の葉組織および葉肉プロトプラストから植物体を再生し、クローン個体からの種子獲得を図った。なお、クローン個体の一部については、花粉形成状況と花粉発芽率 (30% ショ糖を含む LS 寒天培地に花粉を置床し、25℃ で 8 時間培養) を調査した。

結果

鉢上げした雑種個体は、活着後、新葉の展開を伴って外葉が伸張する栄養生長過程を経て、抽苔、開花へと発育が進んだ。体細胞雑種はいずれも不結球性で、クローンによって葉形質や生育特性が異なった。

‘シナノグリーン’ と *L. virosa* との体細胞雑種 (SV) 16 クローンの中で、13 クローン個体が両親種に比べてより旺盛な生育を示したのに対し、3 クローン SV-7154、SV-9121 および SV-9211 個体は生育が緩慢で草勢が弱かった。体細胞雑種の葉形質に関しては、SV クロ

ーン全てが両親種の特徴を合わせ持ち、葉形、葉色および葉質等について、概ね‘シナノグリーン’と *L. virosa* との中間的な特性を示した（表 50、図 18、19）が、草勢の弱い2クローン SV-7154 と SV-9121 では葉が左右非対称形でやや奇形となった。また、体細胞雑種個体は葉表面に細毛、中肋部に葉針（刺）を有し、‘シナノグリーン’にはみられない *L. virosa* 特有の形質が優性的に発現した（図 20）。‘Lollo Rossa’ と *L. virosa* との体細胞雑種（LV）は総じて根の張りが弱く、2クローン LV-10136 および LV-10141 では新根の発生が極めて少ないため活着に困難を生ずる場合が多かった。各クローンとも生育は緩やかで、地上部、地下部ともに生育量が小さい傾向にあったが、LV-10141 は特に草勢が弱く、株基部より細い小葉が叢生した。3 LV クローンは葉形と葉質について概ね両親種の中間的な特性を有し（表 51、図 22）、SV クローンと同様、葉表面に細毛の、中肋部に葉針の発生が認められた。‘Lollo Rossa’ は葉身がアントシアニンにより紅に着色したが、体細胞雑種においても同様な色素発現がみられた。着色範囲は‘Lollo Rossa’ よりも広く葉身部全体にわたり、着色程度も強かった（図 23）。‘カルマー MR’ と *L. virosa* との体細胞雑種クローン（CV-11051）個体は、葉形が左右非対称で細長く、ややよじれて奇形を呈した。葉質と葉色については両親種の中間からやや‘カルマー MR’ 寄りの特性を示した。

表 50 ‘シナノグリーン’ と *L. virosa* の体細胞雑種（SV）の葉特性

特 性	シナノグリーン	<i>L. virosa</i>	SV-5311	SV-7154	SV-9145
葉 形	広円	細長楕円	楕円	細長楕円*	楕円
葉 色	緑	濃緑	やや濃緑	濃緑	やや濃緑
葉面のワックス	少	多	中	中	中
葉面のちぢみ	少	平滑	極少	極少	極少
葉縁の切れ込み	中	無	少	少	少
葉縁の波うち	中	無	少	少	少
葉表面の毛	無	多	中	多	中
中肋の葉針	無	多	多	多	多

*左右非対称



図18 レタス品種‘シナノグリーン’、*L. virosa*および両種間の体細胞雑種

左: ‘シナノグリーン’ 右: *L. virosa* 中央: 体細胞雑種 SV-5311



図19 レタス品種‘シナノグリーン’、*L. virosa*および両種間の体細胞雑種の葉形

左: ‘シナノグリーン’ 右: *L. virosa* 中央: 体細胞雑種 SV-5311



図 20 体細胞雑種 SV-5311 の中肋部の葉針



図 21 レタス品種 'シナノグリーン'、*L. virosa* および両種間の体細胞雑種の花器

左: 'シナノグリーン' 右: *L. virosa* 中央: 体細胞雑種 SV-5311

表 51 ‘Lollo Rossa’ と *L. virosa* の体細胞雑種 (LV) の葉特性

特 性	Lollo Rossa	<i>L. virosa</i>	LV-7231	LV-10139	LV-10141
葉 形	扇	細長楕円	楕円	幅広楕円	細長楕円(小)
葉面の着色	中	無	濃	濃	濃
葉面のワックス	少	多	中	中	中
葉面のちぢみ	少	平滑	極少	少	極少
葉縁の切れ込み	中	無	少	少	少
葉縁の波うち	中	無	少	少	少
葉表面の毛	無	多	中	多	極少
中肋の葉針	無	多	中	多	少



図 22 レタス品種 ‘Lollo Rossa’、*L. virosa* および両種間の体細胞雑種

左: ‘Lollo Rossa’ 右: *L. virosa* 中央: 体細胞雑種 LV-7231



図23 レタス品種 'Lollo Rossa'、*L. virosa*および両種間の体細胞雑種の葉形
左: 'Lollo Rossa' 右: *L. virosa* 中央: 体細胞雑種 LV-7231

体細胞雑種は親のレタス品種に比べて少ない葉数で抽苔し、花茎と花枝の伸張、花蕾の着生へと生殖生長が進んだ。花茎には刺の発生がみられ、花枝の広がりや着蕾数については概ね両親種の間であった。また、開花時間についてはレタス品種が朝の数時間、*L. virosa* が夕方までと両親種間で異なる特性を示したが、体細胞雑種ではレタスに比べて開花時間が長く、*L. virosa*に近い開花特性を示した。表52にSV 5クローンとLV 1クローン個体の花器特性を示した。蕾当たり小花数は 'シナノグリーン' と *L. virosa* が約19であったのに対し、両者の体細胞雑種ではSV-9081が24.5、SV-9145が13.3とクローンによりかなりの開きがみられた。花径については、個体間差がみられたが、概して体細胞雑種が両親種に比べて大きく（図21）、小花花卉の長さ、幅の測定値にもその傾向が反映された。体細胞雑種の花弁先端の切れ込みは *L. virosa* と同様浅かった。また、SV-7154では小花花卉の多くが筒状に異常発育し、約8割が管状花となった。SV-9012とSV-9145においても頻度は低いが同様な管状花の発生がみられ、さらに後者では花卉が縦に裂ける奇形小花の発生も認められた。

'Lollo Rossa' と *L. virosa* との体細胞雑種 LV-7231の花の開張程度は両親種に比べて小さく、小花花卉の大きさは中間であった。また、LVクローン個体はいずれも 'Lollo Rossa' と同様、総苞および花卉の先端部と裏にアントシアニン色素を有していた。

開花時の柱頭付着花粉の調査では、両親種に比べて体細胞雑種の花粉数は著しく少なく（表53）、その多くが変形していた。また、柱頭表面に全く花粉粒がみられない個体も認め

られた。抽苔、開花した SV16 クローン、LV4 クローンおよび CV1 クローン由来個体全て自家受粉による稔実種子の着生は認められなかった。

表 52 ‘シナノグリーン’ および ‘Lollo Rossa’ と *L. virosa* 間の体細胞雑種の花器特性

種 類	頭花当たり 小 花 数	花弁長* mm	花弁幅** mm	小花長 mm	備 考
シナノグリーン	19.4±4.6	6.0±0.3	2.2±0.3	10.2±0.4	
Lollo Rossa	21.7±3.7	7.2±0.4	2.9±0.2	11.2±0.4	
<i>L. virosa</i>	18.7±1.2	8.2±0.6	2.1±0.2	14.3±1.1	
SV-7154	16.4±1.1	9.3±2.5	3.2±0.5	16.4±4.2	管状花多
SV-8201	23.9±3.6	8.7±0.6	3.2±0.3	14.3±0.8	
SV-9012	15.3±2.2	7.3±0.4	3.5±0.4	12.2±0.5	管状花
SV-9081	24.5±3.9	11.9±1.0	3.5±0.4	18.1±1.5	
SV-9145	13.3±1.9	8.8±1.4	3.4±0.6	14.8±2.1	管状、奇形花
LV-7231	19.6±3.5	8.1±0.7	3.0±0.2	11.9±1.0	
SVB-1	18.3±2.1	8.6±0.5	3.2±0.4	12.7±0.6	

*小花花弁の長さ **小花花弁の幅

表 53 体細胞雑種の柱頭付着花粉粒数

種 類	花粉粒数		
SV-7154	23.0	±	25.1
SV-8201	0.5	±	0.8
SV-9012	3.7	±	2.7
SV-9121	0.0	±	0.0
SV-9131	0.5	±	0.8
LV-7231	0.0	±	0.0
CV-11051	0.0	±	0.0
シナノグリーン	256.9	±	61.4
Lollo Rossa	199.3	±	57.7
<i>L. virosa</i>	331.8	±	132.4

自家受粉により種子を得ることが困難なため、‘シナノグリーン’と *L. virosa* との体細胞雑種 SV-5311（染色体数 $2n=36$ ；後述）クローン個体に‘シナノグリーン’の花粉を授粉し、戻し交雑種子の獲得を試みた。その結果、数万の交配小花から6粒の肥大黒着色種子を得た。種子重量は0.25～0.98mg（‘シナノグリーン’および *L. virosa* の平均種子重量は、それぞれ 0.81、0.80mg）と幅があり、無菌播種して発芽状況を観察したが、0.90mg 以上の充実した2種子のみが発芽した。2種子ともに発芽に1週間を要し、発芽後の生育も緩慢であった。鉢上げした戻し交雑幼植物体（SVB-1、2）は、その後正常に生育して成体となり、葉形、葉質が‘シナノグリーン’と体細胞雑種との中間的特徴を示した（図24）。葉表面の細毛や葉裏の葉針については、体細胞雑種に比べて発生数が少なく、程度も小さかった。花の大きさは体細胞雑種と‘シナノグリーン’の中間で（表52）、その形状は戻し交雑親により近づき、正常な外観を呈したが、不稔であった。



図24 レタス品種‘シナノグリーン’、*L. virosa*間の体細胞雑種の
‘シナノグリーン’との戻し交雑後代 SVB-1

戻し交雑個体の葉組織由来の再生クローン個体は親株と同様な形態的特徴を有し、外葉の展開、花茎の伸長、さらには開花へと正常な発育を遂げた。SVB-1およびSVB-2由来各3クローン個体について柱頭表面に付着した花粉粒数を表54に示したが、花粉の全くみられないものから200を超えるものまでと個体間差が著しかった。また、花粉発芽に関して、戻し交雑クローン個体では花粉管の伸長が全くみられなかった(表55)。

戻し交雑個体葉肉プロトプラスト由来のカルスは再分化能が高く、3割以上が茎葉を分化した。再分化個体は斉一で、形態的な変異は認められなかった。SVB-2由来プロトプラスト再生クローン83個体について柱頭付着花粉粒数の調査を行った結果を表56に示した。全体として花粉数は少なく、組織培養クローンと同様、個体間差が認められた。組織およびプロトプラスト由来の全ての再生個体において自家受粉あるいはレタス花粉授粉による稔実種子の形成は認められなかった。

表54 戻し交雑個体の組織培養再生クローンの柱頭付着花粉粒数

再生クローン	花 粉 粒 数		
SVB-1-1	0.0	±	0.0
SVB-1-2	0.1	±	0.3
SVB-1-3	201.2	±	33.5
SVB-2-1	0.0	±	0.0
SVB-2-2	56.4	±	8.5
SVB-2-3	0.6	±	0.9

表55 戻し交雑クローン個体の花粉発芽率

種 類	花粉発芽率 %
SVB-1クローン	0.0
SVB-2クローン	0.0
シナノグリーン (対照)	9.3
<i>L. virosa</i> (対照)	5.5

表56 戻し交雑個体SVB-2のプロトプラスト再生クローンの花粉形成状況

柱頭付着花粉粒数*別個体数					
0	- 0.1	- 0.5	- 1.0	- 2.0	- 3.0粒
9	18	33	18	3	2個体

*1 柱頭当たりの平均花粉粒数 (40 柱頭調査)

考察

レタス品種はその形態・生理的特性、栽培地域および利用部位に基づいて6タイプ(クリस्पヘッド、バターヘッド、コス、リーフ、ラテンおよびシステム)に分類される(Ryder, 1979)。本実験で用いた‘シナノグリーン’と‘カルマー MR’はクリस्पヘッド・タイプに属し、ともに固く結球する‘玉レタス’であるが、その葉形質、球の肥大性および発育特性は異なる。‘Lollo Rossa’はロゼット状に葉が展開する不結球性のリーフタイプ品種で、葉面が広く紅に着色する点に大きな特徴がある。一方、*L. virosa*は不結球性で、葉がロゼット状に発生する。葉形、葉針およびアントシアニン色素に関しては種内変異の存在が認められている(Lindqvist, 1960b)が、ここでは葉縁の欠刻が少なく、中肋と茎部に針を有し、紅色色素を持たない系統を用いた。

体細胞雑種(ヘテロカリオン)においては両親のゲノムが混在するため、双方の遺伝子の相互作用に基づいて諸形質の表現型が決定される。‘シナノグリーン’と*L. virosa*の体細胞雑種(SV)は、その多くが葉形質に関して上述の両親種の特徴の中間的特徴を有し、葉形と葉質に関与する遺伝子の多くが共優性的に作用を及ぼしあっていることがうかがわれた。中肋と茎部の針や葉表面の毛などの一部形質については*L. virosa*の特徴が優性的に発現した。Lindqvist(1960c)は野生型の*L. sativa*と*L. serriola*の中肋と茎部の針の発生が単一の優性遺伝子により支配されることを認めているが、本実験の戻し交雑個体での形質発現状況をみると、*L. virosa*の有する針形成の遺伝様式は必ずしも単純でないと推察された。体細胞雑種個体はいずれも不結球であったが、その展開葉は*L. virosa*に比べて立性となり、戻し交雑個体ではより結球に近い体勢を取った。結球性については複数の因子が関与する量的遺伝形質であり、劣性の遺伝様式をとる(Robinsonら, 1983)ものと推察される。従って、結球性の回復にはクリस्पヘッド・タイプのレタスとの戻し交雑を繰り返し、関与する*L. virosa*遺伝子を徐々に除去していく必要がある。また、葉が奇形を呈した個体では花器も異常となり、株全体の生育抑制がみられる一方、葉と花が正常な形態を示した個体は草勢が強く、異種染色体の構成様態(後述)が株の生育と形態に大きな影響を及ぼすことが示唆された。なお、体細胞雑種における草勢の増大は、ジャガイモ(*Solanum tuberosum*)とその野生種(Puitら, 1986; Fishら, 1988; Cardiら, 1993)の組合せにおいても認められており、異種ゲノム間の相互作用に基づくヘテロシスの発現とみることができる。

‘Lollo Rossa’と*L. virosa*の雑種(LV)クローン個体はいずれも株の生育量が両親に比べて小さく、各クローンにおける両種の不完全なゲノム構成(後述)が草勢に反映される形となった。生育ステージによる差異はあるが、概してLVクローンは‘Lollo Rossa’に比べて着色程度が強く、色素発現に関し*L. virosa*ゲノムの関与が類推された。Robinsonら(1983)はレタス類のアントシアニン着色形質の遺伝様式を集約して記述しているが、それによると色素発現に3優性遺伝子*C*、*g*、*R*が関与し、*C*、*g*遺伝子の相補作用により着色が生じ、下位遺伝子*R*(作用強度の異なる4複対立遺伝子が存在)によってその程度が決まるとされる。また、Lindqvist(1960c)は色素遺伝子の発現を変化させる別の2遺伝子の存在を

報告している。前述のように *L. virosa* の中に着色遺伝子を有し、葉や茎などが部分的に紅着色する系統がみられることから、本実験で用いた系統のゲノム内にも着色の強さに影響を及ぼす上記遺伝子のいずれか、あるいは別の着色関連因子が存在している可能性も考えられる。

レタスは自家受精作物で雄蕊先熟のため、通常開花時には多数の花粉が柱頭に付着している。しかし、体細胞雑種においては柱頭付着花粉数が極めて少ないばかりか、その形も変形し、正常な雄性配偶子の形成が認められなかった。また、稔実種子の着生も皆無であった。Eenink ら (1982) は *L. serriola* と *L. virosa* の交雑 F_1 個体において同様な稔性の欠如を報告しており、不稔が雄蕊の機能不全に起因し、雌蕊の生殖機能も極めて低いとしている。また彼らは *L. serriola* の花粉を交雑して稔実種子を得ているが、後代の遺伝解析から雄蕊と雌蕊の稔性が異なる遺伝子の支配下にあると推定している。体細胞雑種にレタス *L. sativa* 花粉を授粉することで少数の種子を得た本実験の結果は、雑種個体の雌蕊機能が不完全ながら保たれていることを示唆する。一方、*L. sativa* と *L. virosa* あるいは *L. serriola* と *L. virosa* の種間交雑で、組合せる親の遺伝子型、交雑の方向により雑種種子形成能が異なるとする報告 (Lindqvist, 1960a; Maisonneuve ら, 1995) からは、倍数性レベルは異なるが、体細胞雑種の不稔が核内の異種ゲノム間の不親和性あるいは核遺伝子と細胞質遺伝子との相互作用に起因すると推量される。なお、戻し交雑個体に関しては、花粉が発芽能力を欠くこと、自家受粉およびレタス花粉授粉のいずれの方法でも稔実種子が得られないことから、雌雄両生殖器官に不稔の原因があるとみられる。

第2節 腐敗性病害抵抗性

材料および方法

体細胞雑種クローン SV-9012、SV-9081、SV-9145 および LV-7231、戻し交雑クローン SVB-2、両親のレタス品種 ‘シナノグリーン’ と ‘Lollo Rossa’ および *L. virosa* を供試し、葉片接種法により軟腐病と腐敗病に対する抵抗性を検定した。体細胞雑種と戻し交雑クローンについては *in vitro* 由来の植物体を、またレタス品種と *L. virosa* については実生植物体を用い、それぞれガラス温室内で鉢養成し、展開葉数6～7枚時に7～8 cmの葉を摘み取って接種検定に供した。採取葉を2、3秒間70%エタノールに浸漬した後1%次亜塩素酸ナトリウム液中に移して1分間殺菌し、3回滅菌水ですすいだ。表面殺菌した葉は9 cm径滅菌プラスチックシャーレ内の0.7%寒天上に葉裏を上にして置床した。腐敗病菌 (*Pseudomonas cichorii*) と軟腐病菌 (*Erwinia carotovora*) はイースト・ペプトン培地で3日間振とう培養した後、 7×10^9 /mlに調製したものを用いた。菌懸濁液に漬けた毛筆で葉裏表面に塗布接種した後、シャーレをパラフィルムでシールして、25℃・暗黒条件の恒温器内に静置培養した。接種6日後に病徴を調査した。発病程度は以下の6基準で判定した。－：病徴が認めら

れない。±：1～2 mm の小病班がわずかに認められる。+：5 mm 前後の病班が認められる。
 ++：10mm 以上の腐敗病班が認められる。+++：葉面の約半分が腐敗している。++++：腐敗
 が葉全体に及ぶ。

結果

接種6日後の腐敗病および軟腐病の発病程度を表 57 に示した。腐敗病に関しては、‘シ
 ナノグリーン’で5～10mm 幅の数個の病班が、また ‘Lollo Rossa’ で葉脈に沿って葉身全
 体に広がる黒褐変腐敗が認められたのに対し、抵抗性の *L. virosa* では小病班がわずか発生
 するに止まった。体細胞雑種 SV-9012、SV-9081、SV-9145 および戻し交雑クローン SVB-2 に
 においては1～2 mm 径の病班が数カ所に散在するのが認められたものの、病徴としては軽微
 で、いずれも *L. virosa* と同程度の抵抗性強度を有するとみられた。LV-7231 では5 mm 前後
 幅の黒褐変病班が数個観察されたが、発病程度は片親の ‘Lollo Rossa’ に比べて著しく低
 く（図 25）、強い抵抗性を有しているものと判断された。

表 57 軟腐病および腐敗病抵抗性検定

接 種 菌	検定材料	発病程度
<i>Erwinia carotovora</i> 軟腐病菌	シノグリン	++
	Lollo Rossa	++++
	<i>L. virosa</i>	—
	SV-9012	±
	SV-9081	±
	SV-9145	±
	SVB-2	—
	LV-7231	±
<i>Pseudomonas cichorii</i> 腐敗病菌	シノグリン	+
	Lollo Rossa	++++
	<i>L. virosa</i>	±
	SV-9012	±
	SV-9081	±
	SV-9145	±
	SVB-2	±
	LV-7231	+

接種6日後に調査

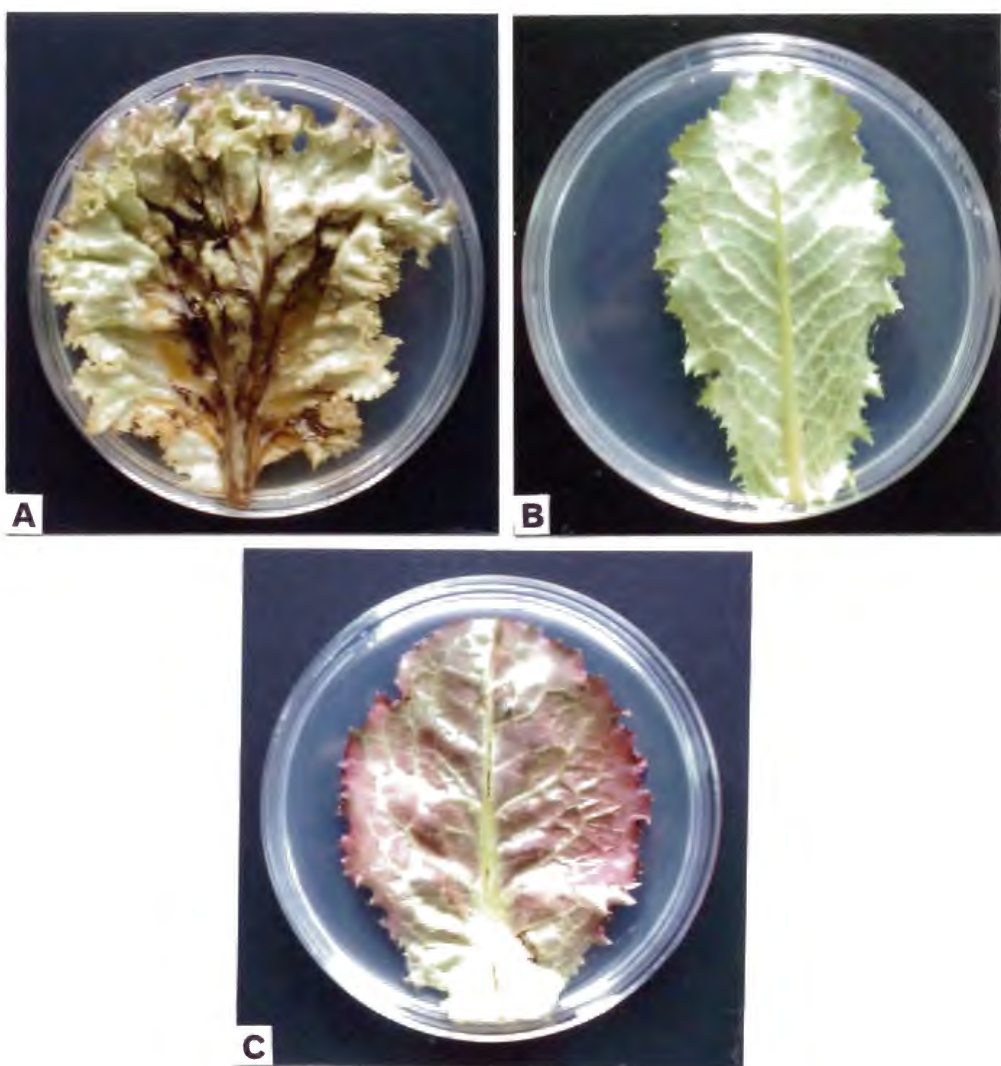


図 25 体細胞雑種 LV-7231 の *Pseudomonas cichorii* 接種検定

A: Lollo Rossa B: *L. virosa* C: LV-7231

軟腐病に関して、レタス親品種の‘シナノグリーン’では葉面の数カ所に10mm前後幅の黒色不整形病班が生じ、一部葉脈の変色もみられた。また、‘Lollo Rossa’では接種1日後に10～20mmの病班が発生し、その後病徴が進展して葉全体に腐敗が及んだ。一方、片親の*L. virosa*は無病徴で、強い抵抗性を示した。体細胞雑種については、いずれも接種1～2日後より小病班が数カ所に点在するのが観察されたが、病徴の著しい進展はみられず、安定した抵抗性を有することが判明した。戻し交雑クローンSVB-2は*L. virosa*と同様強抵抗性で、明確な病徴を示さなかった。

考察

わが国におけるレタスの病害性腐敗には*Pseudomonas*、*Erwinia*および*Xanthomonas*の3属5種の細菌の関与が知られる(土屋ら, 1979)。中でも*Pseudomonas cichorii*と*Erwinia carotovora*は病原性が強く、病徴が進展すると植物体全体に腐敗が及ぶことから、両菌のまん延による被害は甚大なものとなる。

*P. cichorii*と*E. carotovora*はともに発育適温が30℃前後と高く、高温多湿条件下で活発に増殖して、植物体組織および細胞に侵入し、軟化腐敗を誘起する。感染は傷口以外に気孔および毛茸などの自然開口部からも起こることが認められている(白田ら, 1982)。本実験ではRandhawa & Civerolo (1985)による*Xanthomonas*菌のモモ切葉への接種法を参考に、植物体から切り離れた葉に*P. cichorii*と*E. carotovora*菌を無傷塗布接種して、寒天培地に置床する方法で抵抗性検定を行った。

腐敗性細菌に対する植物体の感受性はクリスプヘッド・タイプ品種の場合、若葉より結球葉と生育ステージが進むほど高まる(白田ら, 1982)とされる。しかし、育成した体細胞雑種は非結球性で、生育が進んで生殖生長に移行すると葉質が硬化して感受性が鈍ると判断されたため、ここでは比較的若い展開葉を用いた。

*L. virosa*は腐敗病と軟腐病に対して複合抵抗性を有し、レタス近縁種の中で最も有望な腐敗性病害抵抗性の育種素材として評価されている(塚田ら, 1987)。ここでの葉片接種検定においても*L. virosa*は明瞭な腐敗病徴を示さず、強抵抗性であることが確認された。レタス品種については、‘シナノグリーン’および‘Lollo Rossa’は、*P. cichorii*と*E. carotovora*菌の接種により発病を呈したが、‘Lollo Rossa’が葉全面に広がる腐敗病徴を示したのに対し、‘シナノグリーン’は1cm前後の不整形病班を形成するに止まった。このような病徴の品種間差は葉質等の形態的特性や内的な感受性レベルの違いに基づくもので、葉肉が薄く、柔らかい‘Lollo Rossa’では菌が侵入しやすく、侵入菌の組織内部での移行・増殖に伴って病徴が急速に拡大進展したと推量される。一方、体細胞雑種と戻し交雑クローン個体はいずれも*P. cichorii*と*E. carotovora*に対して*L. virosa*と同レベルの強い耐性を示した。この結果は抵抗性が遺伝形質であることを明示すると同時に、抵抗性因子の作用が優性的であることを示唆する。

栽培種と野生種間の体細胞雑種において野生種の病害(細菌、糸状菌)抵抗性が優性的に

発現した例として、*Solanum tuberosum* (ジャカイモ) + *S. brevidens* の *Erwinia* 抵抗性 (Austin ら, 1988)、*Solanum melongena* (ナス) + *S. torvum* (Guri & Sink, 1988) および *S. tuberosum* + *S. torvum* (Jadari ら, 1992) の *Verticillium* 抵抗性が知られ、特に Austin ら (1988) によるジャガイモ体細胞雑種の *Erwinia* 抵抗性に関する報告では、罹病性親 (*S. tuberosum*) との 2 回の戻し交雑を経た後も高レベルの抵抗性を保持していることが認められている。

異種間体細胞雑種においてはそのゲノム動態の複雑さ故に、形質発現に関与する遺伝子の数や作用性、両親種ゲノム間の対応遺伝子座の有無などの遺伝解析が容易でないため、耐病性等諸形質の遺伝については多くが未解明の状況にある。ここでのレタス体細胞雑種の腐敗性病害抵抗性の遺伝に関しても不明な点が多く残されており、今後、雑種後代の育成をはかり、抵抗性の発現状況を調べる中で、その遺伝性を明らかにしていく必要がある。

第3節 染色体構成

材料および方法

細胞融合親として用いたレタス *L. sativa* 3 品種 ‘シナノグリーン’、‘Lollo Rossa’ および ‘カルマー MR’ と野生種 *L. virosa*、育成した両種の体細胞雑種 SV16 クローン、LV4 クローン、CV1 クローンおよび戻し交雑 SVB2 クローンの幼植物体より根組織を採取し、0.002M 8-オキシキノリンに室温下で 3 時間浸漬して前処理を行い、水洗後、エタノール:酢酸 = 3 : 1 液で固定した。固定した根組織を蒸留水に 15 分間浸漬 (シャーレ内) した後、スライドガラス上で根端の生長点近傍部を切り取り 1.5ml マイクロチューブ内の細胞解離用酵素液 (50 μ l) に浸漬し、37°C 下で約 40 分間酵素処理を行った。酵素液の組成は 4% セルラーゼ “オノズカ” RS、1.5% マセロザイム R200、0.3% ペクトリアーゼ Y-23 および 1mM EDTA とした。酵素処理後、根端を静かにピペットで吸い取り、シャーレ中の蒸留水に 10 分間漬けて洗浄を行った。洗浄根をスライドガラス上に移して周囲の水分を取り除き、展開液 (固定液と同組成) を 1 滴たらしてピンセットで組織を崩しながら広げた。風乾後、スライドガラスを 2% ギムザ液 (リン酸バッファー pH6.8 で希釈) に浸けて 10 分間染色した。蒸留水中で 1 分洗浄し、風乾後に検鏡した。

‘シナノグリーン’ と *L. virosa* の体細胞雑種 SV-9081 および戻し交雑クローンについては、その染色体の由来を明らかにするため、Genomic *in situ* hybridization (GISH) を実施した。上記の酵素解離法で両クローン個体根端組織から染色体標本 (ギムザ染色後メタノールにより脱染) を作成し、スライドガラス上の標本を 600 μ l の RNase 溶液 (0.1mg/l RNase A、2 \times SSC) で覆って RNA 分解処理を行った (37°C、60 分)。RNase 処理後、室温下で 2 \times SSC に 5 分、70、95 および 99% エタノールに各 5 分浸漬して洗浄した。プローブとして ‘シナノグリーン’ 全ゲノム DNA を用い、ランダムプライマー法によりピオチン標識を行った。すなわち、熱変性した 10 μ l の ‘シナノグリーン’ DNA 溶液 (0.1 μ g/ μ l) に dATP、

dCTP、dGTP を含む反応バッファー（ニッポンジーン社）10 μ l、BSA (Bovine Serum Albumin) (10mg/ml) 2 μ l、ピオチン-16--dUTP (1mM) 2 μ l、滅菌水 24 μ l および Klenow 断片 (1U/ μ l) 2 μ l を加え（全量 50 μ l）、37°C で 3 時間反応を行うことにより標識プローブを作成した。標識プローブはエタノール沈澱による精製後 *in situ* ハイブリダイゼーションに供したが、使用量は 1 標本当たり 100ng とし、100 倍量の *L. virosa* DNA（ブロッキング用、5 分間オートクレーブ加圧し切断処理したもの）、50%ホルムアミドおよび 2 \times SSC を含むハイブリダイゼーション溶液に混合して用いた。標識プローブを含むハイブリダイゼーション液（15 μ l）は 90°C で 10 分の熱処理後、急冷して DNA 変性を行い、染色体標本上に滴下してカバーガラスで覆った。ペーパーボンドで周囲をシールして 37°C で 1 夜ハイブリダイゼーション処理を行った後、2 \times SSC、50% ホルムアミド/2 \times SSC、2 \times SSC および 4 \times SSC の溶液に順に各 42°C、10 分間浸けて洗浄した。5% BSA を含む BT バッファー（10mM Sodium hydrogen carbonate、0.05% Tween-20、pH 8.3）での 37°C、5 分間のブロッキング処理に続き、標本当たり 70 μ l のアビジン-FITC（5 μ g/ml）を含む 1% BSA/4 \times SSC 液をサンプル上に広げて 37°C、60 分間（湿箱暗黒下）の FITC 染色を行った。BT バッファーで 3 \times 10 分（40°C）洗浄した後、5% goat serum/BT で 37°C、5 分間のブロッキング処理を行い、70 μ l のピオチン化抗アビジン/BT 溶液（10ng/ml）を滴下して、湿箱中で 37°C、60 分間反応させた。BT バッファーでの 3 \times 5 分（40°C）の洗浄に続き、5% BSA/BT でブロッキングし、再びアビジン-FITC 処理（アビジン-FITC/BT）を行ってシグナルの増幅を図った。BT バッファーで 2 \times 10 分（40°C）および 2 \times SSC で 10 分（40°C）洗浄した後、100 μ l の DAPI（4',6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride）液（10 μ g/ml）をサンプル上に広げて室温下で 10 分間の対比染色を行った。短時間の水洗後、抗退色封入剤の 1% DABCO（1,4-diazabicyclo[2,2,2]octane）を滴下してカバーガラスで覆い、蛍光顕微鏡で観察した。観察した染色体像はコンピューターに取り込み、シグナル強調等の画像処理を施して解析を行った。

さらに、戻し交雑個体について、生殖細胞形成時の染色体の動態を知るために、花粉母細胞における減数分裂の状況を調べた。ガラス温室内で育成した SVB-1 と SVB-2 クローンの抽苔個体より 3~4 mm の蕾を採取し、エタノール：酢酸=3：1 液で固定した。染色と標本作成はフォイルゲン染色・押しつぶし法により行った。

結果

表 58 に示すように「シナノグリーン」と *L. virosa* との体細胞雑種 16SV クローンのうち 9 クローンは染色体数が $2n=36$ で、レタス *L. sativa* ($2n=18$) と *L. virosa* ($2n=18$) の合計染色体数に等しく、両親種の間中型の形態を示した。残りの 7 クローンは $2n=28\sim53$ と異数性を呈し、その形態は中間型のものから葉が奇形化するものまでと多様であった。

図 26 に異数性 4 クローン個体の草型を示した。異数性クローンのうち、SV-7154 は $2n=46$ が基本数で、一部 53 染色体を有する細胞が認められた。SV-7154 の葉形は前述のようにや

や奇形となり、葉表面が粗く、光沢を欠いた。SV-9121（2n=28）は葉柄部の葉幅が狭く、葉上部がややよじれる特徴を有した。SV-9145（2n=32）は葉先が尖り、葉形も若干非対称形となったが、生育は旺盛であった。SV-8191は2n=48と多染色体を有し、葉形と葉質が中間型に比べて‘シナノグリーン’寄りの特性を示した。

表 58 体細胞雑種の染色体数と形態的特性および稔性

雑種クローン	染色体数	形態的特徴	稔 性
SV-5311	36	中間型	不 稔
SV-7151	40	細長葉、非対称	不 稔
SV-7152	36	中間型	不 稔
SV-7153	36	中間型	不 稔
SV-7154	46,53	奇形葉	不 稔
SV-8191	48	中間型	不 稔
SV-8201	36	中間型	不 稔
SV-9012	36	中間型	不 稔
SV-9081	34	中間型	不 稔
SV-9121	28	葉のよじれ	不 稔
SV-9131	36	中間型	不 稔
SV-9132	36	中間型	不 稔
SV-9133	36	中間型	不 稔
SV-9145	32	中間型、葉先の尖り	不 稔
SV-9211	44	葉細長、非対称	不 稔
SV-10191	36	中間型	不 稔
LV-7231	32	中間型	不 稔
LV-10139	42	中間型（短葉長）	不 稔
LV-10141	52	小葉	不 稔
CV-11051	52	奇形葉	不 稔



SV-7154($2n=46, 53$)



SV-8191($2n=48$)



SV-9121($2n=28$)



SV-9145($2n=32$)

図 26 ‘シナノグリーン’ と *L. virosa* 間の異数性体細胞雑種の草姿

‘Lollo Rossa’ と *L. virosa* の雑種 3 LV クローン個体はいずれも異数体であった(表 58)。図 27 に異数性 3 クローン個体の草型を示した。LV-7231 ($2n=32$) は両親種の間接型の葉形態を有し、他 2 クローンに比べて安定した生育を示した。LV-10139 ($2n=42$) は LV-7231 に比べて葉面の起伏が大きく、葉長の短い幅広楕円の葉形を呈した。また、LV-10141 ($2n=52$) は草勢が弱く、外葉の展開が不規則かつ緩慢で、生育途中で枯死する株が多かった。

‘カルマー MR’ と *L. virosa* との雑種クローン CV-11051 は 52 染色体を有した(表 58)。その葉形は前述のようにやや奇形で葉面が粗く、不安定な生育を示した。



図 27 ‘Lollo Rossa’ と *L. virosa* 間の異数性体細胞雑種の草姿

核型に関して、レタス *L. sativa* と *L. virosa* 両種の染色体の長さは類似したが、いくつかの種特異的な特徴が認められた（図28）。*L. sativa* の9対の染色体は動原体位置が概ね次端部～中部にあり、長さが中位の2染色体対で付随体が観察された。一方、*L. virosa* においては1対の付随体の存在が確認され、7染色体対で *L. sativa* と同様、次端部～中部に動原体部位を認めたが、短い2染色体対については動原体位置が端部に近く、対応する *L. sativa* 染色体と形態を異にした。

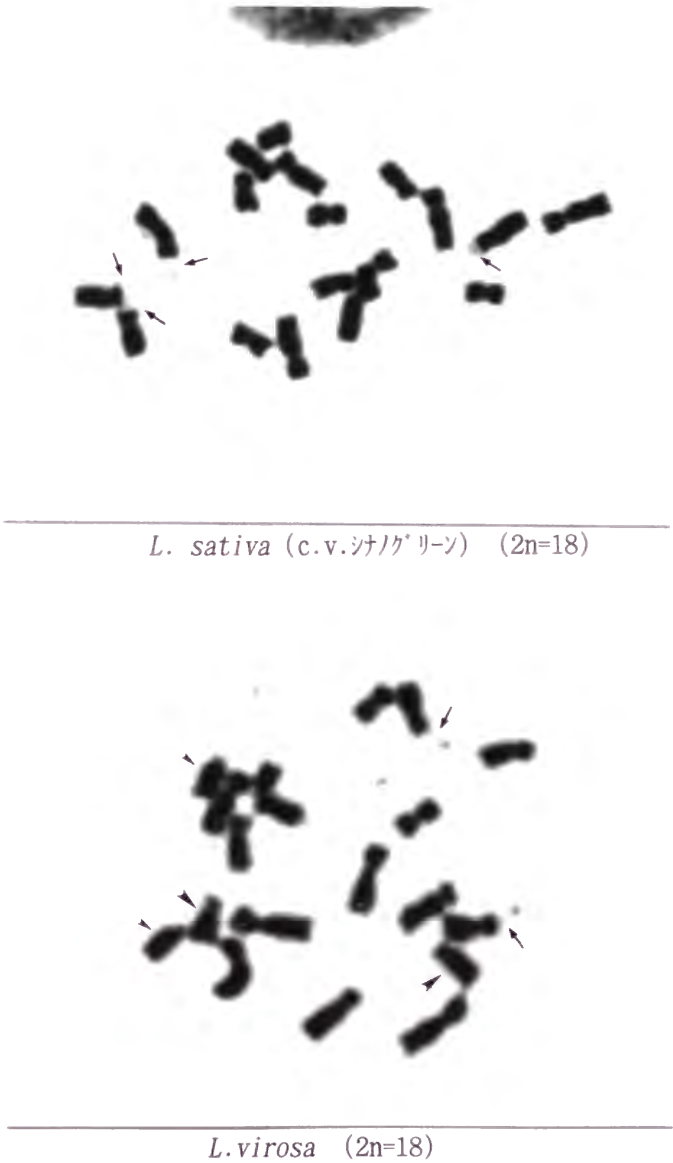


図28 両親種の染色体

→ : 付随体

▶ : 大 - 第7染色体 小 - 第8染色体 (*L. virosa*)

体細胞雑種においては両種の染色体が混在し、染色体数により構成内容が異なるとみられたが、形態面から両親種の個々の染色体を識別することは困難であり、その構成比を明らかにすることはできなかった。SV 3 クローン、LV 1 クローンおよび CV 1 クローンについて *L. virosa* ゲノムに特有の腕比（長腕長/短腕長）の大きい 2 対の次端部動原体染色体をマーカーとして、核型の検討を行った結果を図 29～33 に示す。SV-9012 ($2n=36$) は 2 対のマーカー染色体を有し（図 29）、SV-9081 ($2n=34$) は両マーカー染色体各 1 本を（図 30）、SV-8191 ($2n=48$) は小マーカー染色体 1 対と大マーカー染色体 1 本を（図 31）有することが判明した。また、SV-8191 では断片化したとみられる 1 小染色体が観察された。LV-7231 ($2n=32$) は小マーカー染色体 1 対と大マーカー染色体 1 本を有した（図 32）。CV-11051 ($2n=52$) においては 3 本のマーカー染色体（大小は不明）が観察された（図 33）。



図 29 体細胞雑種 SV-9012 染色体 ($2n=36$)

大矢印は大マーカー染色体 (*L. virosa* 第 7 染色体)

小矢印は小マーカー染色体 (*L. virosa* 第 8 染色体)

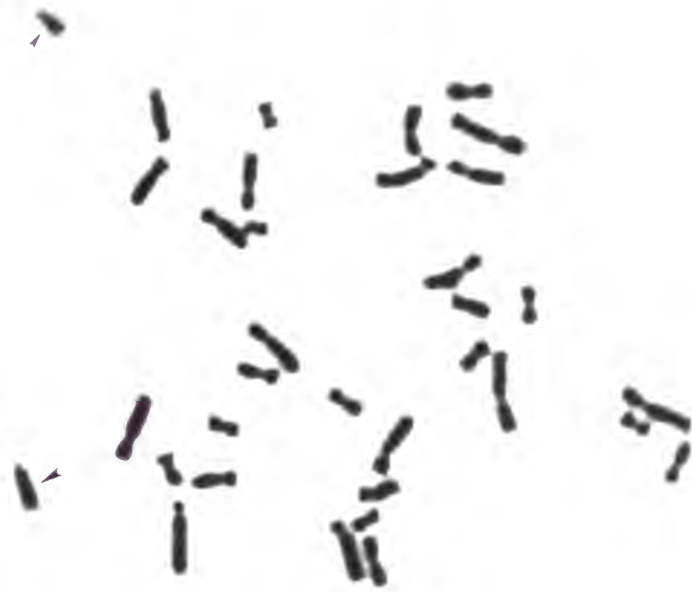


図 30 体細胞雑種 SV-9081 染色体 ($2n=34$)

大矢印は大マーカー染色体 (*L. virosa* 第7染色体)

小矢印は小マーカー染色体 (*L. virosa* 第8染色体)



図 31 体細胞雑種 SV-8191 染色体 ($2n=48$)

▶ : 大 - *L. virosa* 第7染色体 小 - *L. virosa* 第8染色体

→▶ : 断片化染色体

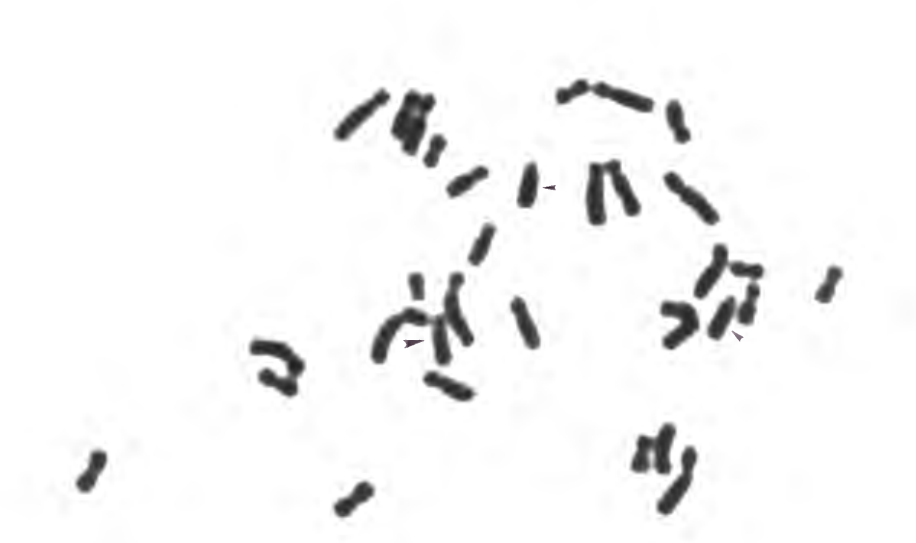


図 32 体細胞雑種 LV-7231 染色体 ($2n=32$)

大矢印は大マーカー染色体 (*L. virosa* 第7染色体)

小矢印は小マーカー染色体 (*L. virosa* 第8染色体)



図 33 体細胞雑種 CV-11051 染色体 ($2n=52$)

矢印は *L. virosa* マーカー染色体を示す

SV-9081 の GISH 像を図 34 に示した。いずれの染色体も蛍光シグナルを発したが、‘シナノグリーン’ 由来とみられるシグナル強度の強い染色体数は 18 前後で、*L. virosa* 由来のマーカー染色体は弱シグナル染色体中に含まれた。

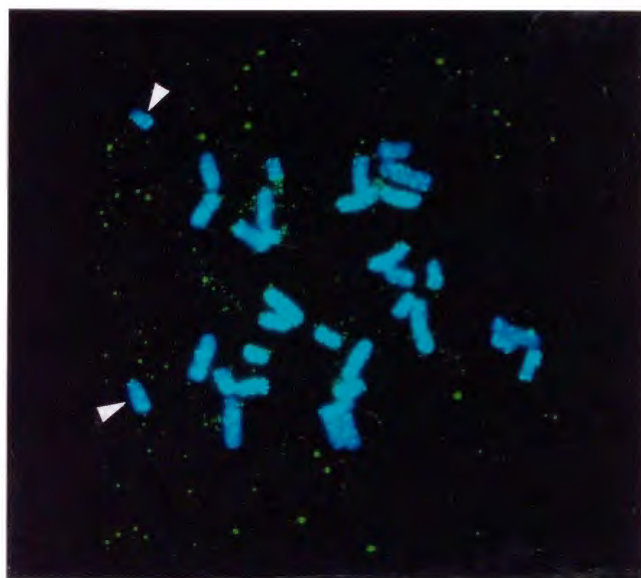


図 34 体細胞雑種 SV-9081 (2n=34) の GISH 像
矢印は *L. virosa* マーカー染色体を示す

戻し交雑 2 クローンとともに $2n=27$ で、マーカー染色体については大小各 1 本を有した (図 35)。GISH による戻し交雑個体 SVB-1 の体細胞染色体像を図 36 に示したが、27 染色体中 18 が強シグナルを発し、他と明確に識別された。また、SVB-1 の花粉母細胞は異常な減数分裂を呈し、第 I 分裂中期において I 価と II 価染色体のほかに多価部分対合染色体の出現が認められた (図 37)。減数した染色体 (娘染色体) は第 II 分裂後期に両極へ移動し、四分子を形成した。



図 35 戻し交雑個体 SVB-1 染色体 ($2n=27$)
 大矢印は大マーカー染色体 (*L. virosa* 第 7 染色体)
 小矢印は小マーカー染色体 (*L. virosa* 第 8 染色体)

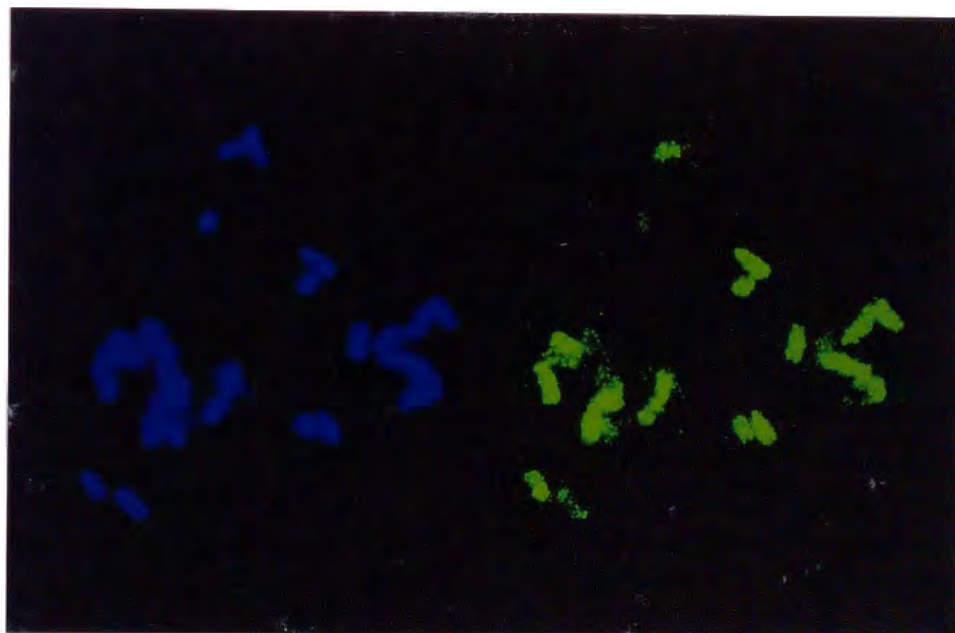


図 36 戻し交雑個体 SVB-1 染色体の GISH 像
 左 : DAPI 染色像 右 : GISH 像

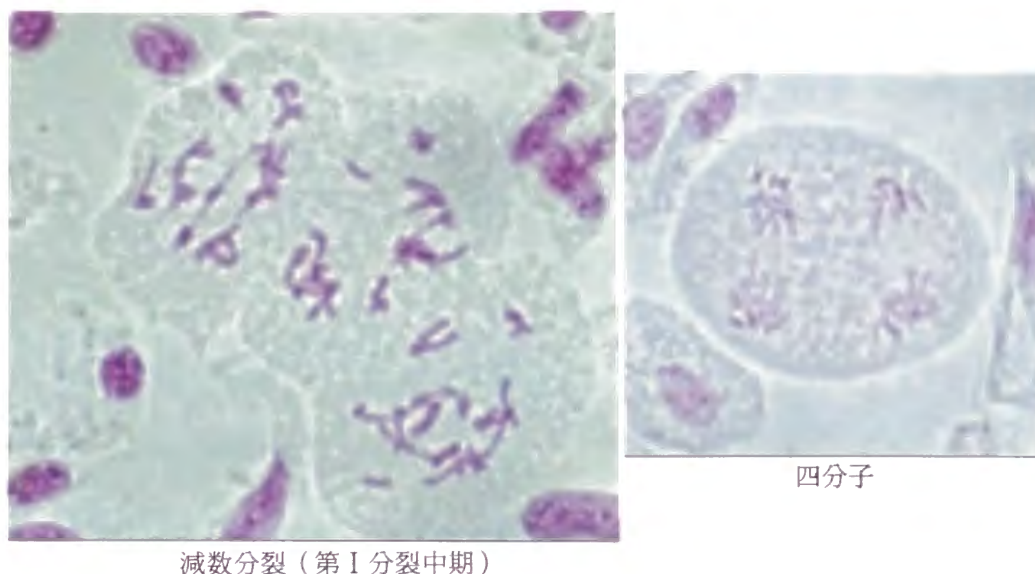


図 37 戻し交雑個体 SVB-1 花粉母細胞の減数分裂及び四分子形成

考察

体細胞雑種 20 クローンの染色体数は $2n=28\sim53$ と幅があり、うち両親種のゲノムを合わせ持つ異質 4 倍体（複 2 倍体）（ $2n=2x+2x=36$ ）とみられるクローンが約半数を占め、他は異数体であった。異数性の 11 クローンについては 4 クローンが 4 倍性の、2 クローンが 6 倍性の低異数体で、残りの 5 クローンが $4x$ と $6x$ の中間の染色体数を示した。4 倍性の低異数体は両種細胞が 1 : 1 に融合した異質 4 倍性のヘテロカリオン細胞に由来し、培養過程で一部染色体が欠失したことにより生じたものと推定された。本実験では $6x$ 以上の倍数体は認められなかったが、高次倍数性個体の発生原因としては、多細胞の融合、2 倍性 G2（後 DNA 合成期）細胞と 4 倍性 G1（前 DNA 合成期）細胞の融合および 4 倍性細胞での染色体倍加があげられ（Puit ら, 1986; Cardi ら, 1993）、 $4x$ を越える異数体は $6x$ 細胞からの染色体脱落あるいは $4x$ 細胞における一部染色体の倍加により生じたものと考えられる。 $2n=52$ の 6 倍性低異数体は正 6 倍性細胞の染色体欠失の結果生じた可能性が大きいが、 $2n=40\sim48$ の中間型異数体については染色体の構成内容により成因が異なるものとみられる。

染色体数は葉の形態、生育速度および生育量など諸形質の表現型に影響を及ぼした。異質 4 倍体と 4 倍性低異数体が両親種の間接型の形態を有し、正常な生育パターンを示したのに対し、6 倍性低異数体および $2n=40$ 以上の異数体の多くは葉の奇形、草勢低下および生育遅延等の生育異常を生じた。これら異数性個体の異常生育は両種染色体のアンバランスな組合せに起因するものと考えられたが、倍数体的性格を有するが故に致命的な障害とはならなかった。

前述のように、レタス (*L. sativa*) と *L. virosa* は、他の 2 野生種 *L. serriola* および *L. saligna* とともに *Lactuca* 属の中で遺伝的に近縁な一群として位置づけられ、 $2n=18$ のい

いわゆる‘*serriola*グループ’を形成するが、核型に関して*L. virosa*と他の3種との間には明らかな差異が認められる(Lindqvist, 1960a; Koopmanら, 1993)。Lindqvist (1960a)によれば*L. sativa*、*L. serriola*および*L. saligna*の染色体形態は類似し、長い染色体対で次中部～次端部に、短い染色体対では中部に動原体位置があり、第3と5染色体に付随体を有するのに対し、*L. virosa*は他3種の第5染色体に相当する1染色体対のみが付随体を有し、第7と8染色体の短腕が短い(腕比が4以上)点に特徴があるとされる。また、Koopmanら(1993)は染色体長、動原体部位および付随体の有無の形態的特徴に加えて、C-バンドやN-バンド法を用いた分染により個々の染色体の同定を試み、*L. sativa*、*L. serriola*および*L. saligna*においては9染色体対がいずれも動原体領域に明瞭なCバンドを有するのに対して、*L. virosa*染色体では同部位にバンドを欠き、4(第1・2・5・9染色体)および2(第5・9染色体)染色体対の長腕部に前3種にはみられない特異的なC、Nバンドが存在することを明らかにし、さらに*L. virosa*の第7・8染色体での分染バンドの欠如を認めている。本実験ではこれら報告にあるレタスとは明らかに異なる動原体位置を持つ*L. virosa*の第7・8染色体を核型マーカーとして体細胞雑種の染色体構成を探った。

異質4倍体のSV-9012は両マーカー染色体各1対を有し、核型面からも複2倍体としての根拠が示された。調査した異数体の多くが大、小マーカー染色体(第7・8染色体)の双方あるいは片方を1本欠き、*L. virosa*に特徴的なこれら2染色体がヘテロカリオン細胞の分裂過程で脱落しやすい性質を持つことが示唆された。4倍性低異数体SV-9081については、染色体数($2n=34$)およびGISHの結果を考量すると、複2倍性ゲノムから*L. virosa*の第7・8染色体が欠失した*L. sativa* $2x + L. virosa$ $2x - 2$ のゲノム構成をとるものと推定された。また、 $4x$ と $6x$ の中間型の異数体SV-8191は、染色体数($2n=48$)および*L. virosa*マーカー染色体の数から、*L. sativa* $4x + L. virosa$ $2x$ の6倍性融合細胞に由来し、*L. sativa*染色体の比率が高いと推定された。LV-10391($2n=42$)とCV-11051($2n=52$)についても同様に*L. sativa*ゲノムの構成比率が相対的に高いことがうかがわれた。これら異数体については葉形、葉質等の形質が*L. sativa*に寄る傾向を示し、両種のゲノム構成比が表現型に反映された。

異質4倍性クローンと*L. sativa*との戻し交雑個体の染色体数は $2n=27$ で、核型観察およびGISHによる染色体染め分けの結果から、その染色体構成は*L. sativa* $2x + L. virosa$ x と推定され、戻し交雑過程での両種のゲノム挙動の独立性が示唆された。また、戻し交雑個体の減数分裂はその染色体構成故か、多様な様相を呈した。Lindqvist(1960a)は‘*serriola*グループ’内種間雑種の減数分裂において多価染色体の出現を認めず、その原因を同グループ種染色体の非転座性に帰している。ここでの多価部分対合染色体の出現は両種染色体の同祖性に基づくものとも解されるが、戻し交雑時に非相同染色体間に生じた相互転座に起因するとの見方も否定できない。いずれにせよ、減数分裂の異常が戻し交雑個体の不稔の主因であることは疑いなく、染色体倍加等のゲノム操作による稔性回復が今後の課題として残された。

第6章 レタスの体細胞雑種のアイソザイムおよび遺伝子分析

体細胞雑種は両親種の遺伝子を合わせ持つが、融合時あるいは細胞分裂過程での種々の要因の影響によって遺伝情報を担う核内染色体や細胞質内小器官（葉緑体、ミトコンドリア）の遺伝子構成に変化を生ずる。本章ではアイソザイムおよびDNA分析により体細胞雑種の遺伝的雑種性を分子レベルで調査した。そして体細胞雑種の核内・核外遺伝子の構成を分析した。

第1節 アイソザイム分析

材料および方法

レタス品種‘シナノグリーン’あるいは‘Lollo Rossa’と *L. virosa* との体細胞雑種 (SV、LV)、それぞれ6、3クローンを供試し、エステラーゼ (EST) とロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) の2種のアイソザイム分析を行った。サンプルの調製には *in vitro* 育成の幼植物体葉約0.1gを用い、氷上の乳鉢内で0.4mlの冷抽出バッファー (0.1M リン酸バッファー pH7.2、10mM ジチオスレイトール、10% ポリビニルピロリドン、3% ポリエチレングリコールおよび0.5%メルカプトエタノール)を加えて磨砕した。磨砕液は1.5ml マイクロチューブに移して15000rpm (4℃)で15分間遠心分離し、上清を電気泳動に供した。泳動は垂直スラブ型泳動槽でTris-HClでpHを調整した7%アクリルアミドゲルを用いて実施した。濃縮ゲルと分離ゲルのpHは、エステラーゼについてはそれぞれ6.7、8.9、ロイシンアミノペプチダーゼについては5.5、7.5とした。電極用バッファーとしては、エステラーゼに対してはTris-グリシン (pH 8.3)を、ロイシンアミノペプチダーゼに対してはTris-バルビタール (pH 7.0)を用い、抽出サンプル各50 μ lをゲルに載せ、低温 (4℃)下、定電圧200Vで約150分間泳動した。電気泳動後、ゲルを反応液に浸して酵素染色を行い、バンドパターンを調べた。反応液組成としては、エステラーゼに対しては0.5mM 1-ナフチール酢酸、0.05mM 2-ナフチール酢酸、0.1M リン酸バッファー pH 7.0および0.1% フェーストブルーRR塩を、ロイシンアミノペプチダーゼに対しては0.3mM L-ロイシル-2-ナフチールアミド、0.05M 酢酸ナトリウムバッファー pH 5.0および0.02% フェーストブラックK塩を用いた。検出バンドについては便宜的に陰極側から順に、ESTはE1、E2、…、LAPはL1、L2のように番号を付した。

結果

図38と39に活性染色によるESTおよびLAPのバンドパターンを示した。ESTに関して‘シナノグリーン’では濃淡6本のバンド (E1、E3、E5、E7、E8、E9)が、また‘Lollo Rossa’でも同じく6本のバンド (E1、E2、E4、E5、E8、E9)が検出され、4本のバンド (E1、E5、E8、E9)については両品種共通であった。*L. virosa*では3本のバンド (E4、E5、E6)が観

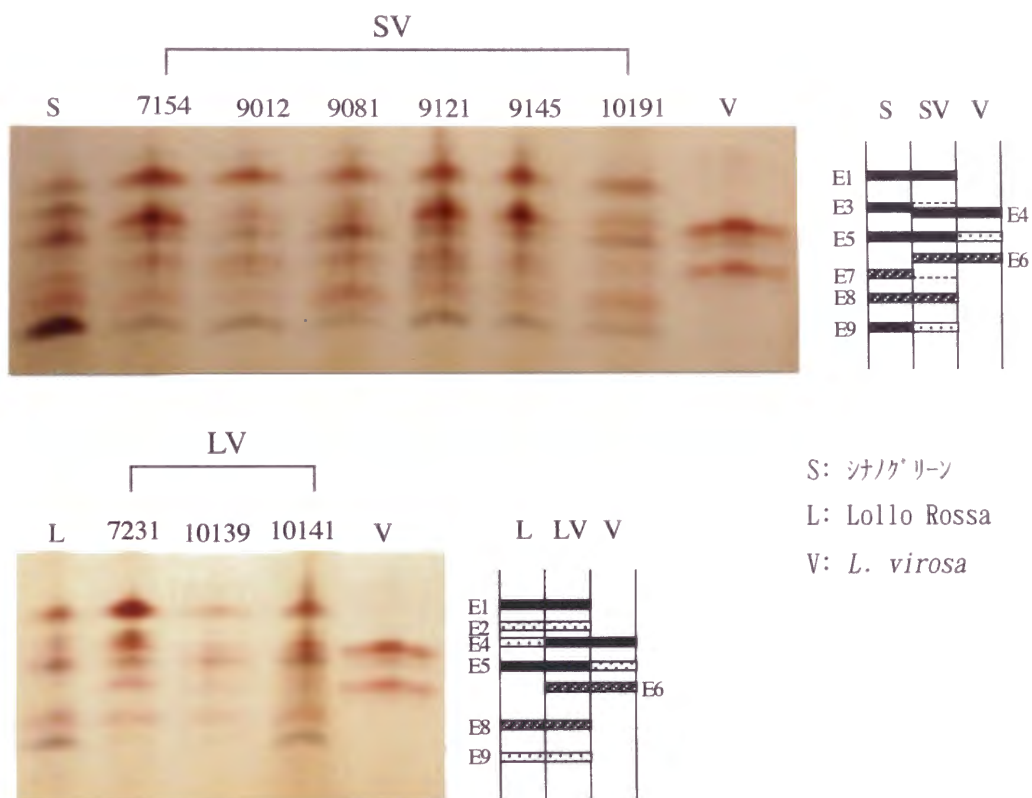


図38 体細胞雑種のエステラーゼザイモグラム

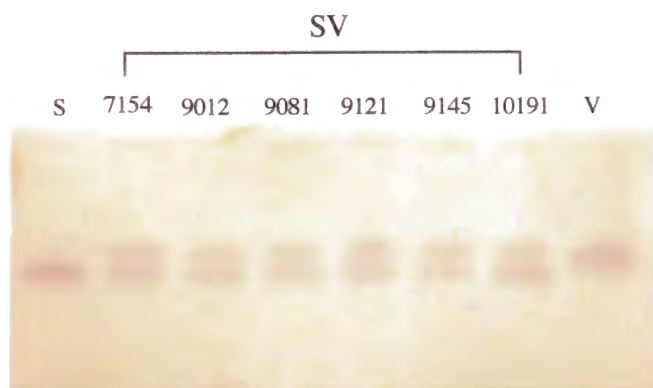


図39 ‘シナク⁺リン’ と *L. virosa* 間の体細胞雑種のロイシンアミノ
ペプチダーゼのバンドパターン

察され、そのうち‘シナノグリーン’とは1本(E5)が、‘Lollo Rossa’とは2本のバンド(E4、E5)が共通していた。6SVクローンは全て同様なバンドパターンを示し、両親種のバンドを合わせ持った。しかし、‘シナノグリーン’由来の2バンド(E3、E7)の発色は淡く、クローンによっては確認が困難であった。3 LV クローンについては、濃淡の差はあるものの、SVと同様に両親のバンドを合わせ持ち、雑種性が確認された。

LAP に関しては、‘シナノグリーン’、‘Lollo Rossa’および *L. virosa* ともに明瞭に発色する1バンドを有した。‘シナノグリーン’と‘Lollo Rossa’のバンド(L2)は同位置にあり、*L. virosa*のバンド(L1)はこれよりやや移動度の遅い上部に存在した。供試体細胞雑種SVおよびLVクローンはいずれも両親種の2バンドを合わせ持った。

考察

アイソザイムは基質特異性を同じくする酵素種の分子多型で、その遺伝的変異の多様なことと異種間で高頻度に多型が認められることから、植物における体細胞雑種の同定に広く用いられている。レタスおよびその近縁種のアイソザイム分析に関しては Kesseli & Michelmores (1986) の報告がある。本実験で用いた加水分解酵素 EST と LAP については、その報告の中で、種内あるいは種間での多様な多型変異が示され、それぞれのアイソザイム発現に関与する8および2遺伝子座のうち、5および1遺伝子座で対立関係にある多型バンド(酵素分子)の存在が明らかにされている。特に EST は関与遺伝子座数が多く、多型変異に富むことが示されており、他植物種での多様な酵素多型検出例(遠藤, 1977)を考え合わせると、より遺伝的分化の進んだ酵素種とみることもできる。

供試レタス品種は固定種であり、*L. virosa* も自殖性であるが故に遺伝的に固定しているとみられることから、現れた複数のバンドはいくつかの異なる遺伝子の支配下にあると推定される。従って、幼植物体葉における EST 遺伝子の発現には、レタスで多くて6遺伝子座、*L. virosa* で3遺伝子座が関与しているものと考えられる。その発現パターンから、両親種に共通の E4、E5 は同祖性で、E6 は *L. virosa* 特有のアイソザイム遺伝子座に起因するバンドであると推定された。体細胞雑種は両親種の EST バンドを合わせ持ち、その雑種性が確認されたが、同じキク科の *Rudbeckia* 属の種間体細胞雑種でみられるような新たな雑種バンドの出現(Al-Atabee ら, 1990) は認められなかった。これは両親の EST 酵素が単量体であるためと考えられる。ただし EST は関与遺伝子座数が多く、個々のアイソザイム遺伝子間の相互作用については不明な点が多いため、詳細についてはさらに検討を要する。

LAP に関しては、両種がそれぞれ移動度の異なる1本のバンドを有し、異ゲノムに存在する2つの遺伝子座が多型発現に関与していることが示唆された。Kesseli & Michelmores (1986) も同様に、*Lactuca* 属の LAP 分析で2遺伝子座(Lap1, Lap2)の存在を認めており、ともに幼苗期発現多型に関しての分析結果であることから、L1、L2 が Lap1、Lap2 と同一の遺伝子に由来するバンドである可能性は大きい。体細胞雑種は両親種の L1 と L2 バンドを合わせ持ったが、雑種バンドの出現は認められず、類似したバンドパターンをとる *Brassica*

種間雑種に関する報告 (Arus ら, 1982; Terada ら, 1987; Fahleson ら, 1988) と同様、単量体型酵素種としての LAP の分子構造が示唆された。

第2節 遺伝子分析

材料および方法

レタス品種 ‘シナノグリーン’、‘Lollo Rossa’ あるいは ‘カルマー MR’ と *L. virosa* との体細胞雑種、それぞれ、10SV、4 LV および 1 CV クローンと、戻し交雑後代2クローン (SVB-1 と SVB-2) を供試し、核内遺伝子および細胞質 (葉緑体、ミトコンドリア) 遺伝子の RFLP 分析を実施した。

[核内遺伝子]

体細胞雑種各クローン個体の葉より、CTAB 法に従って全ゲノム DNA を抽出し、抽出 DNA 10 μ g を制限酵素 *Eco* R I で切断処理した。制限酵素処理された DNA はアガロースゲルを用いての電気泳動の後、アルカリブロットングによりナイロンフィルターに転写した。制限酵素処理、電気泳動およびブロットングは第3章・第2節と同様な方法で行い、DNA 転写フィルターは DNA プローブとのハイブリダイゼーションに供した。プローブとしてはイネリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) (北陸農試 育種工学研究室より分譲) とレタス 3 cDNA クローン (Sc57, Sc59, Sc63) を用いた。レタス cDNA クローンは、‘シナノグリーン’ 若植物体葉由来であり、グアニジンチオシアネート/CsCl 法 (渡辺, 1989) により抽出した全 RNA から調製した mRNA を鋳型として合成した cDNA 断片を pUC18 の *Hinc* II サイトに挿入してクローニングしたものである。ハイブリダイゼーションは rDNA については ECL システムを、レタス cDNA クローンについては DIG システムを用いて、第3章と同様な方法で実施した。

[細胞質遺伝子]

上述の核内遺伝子と同様な方法で葉緑体とミトコンドリア遺伝子のハイブリダイゼーション分析を行った。プローブにはオオムギ葉緑体 DNA クローン pHVH1、pHVH8 および pHVH10 (東京大学 平井篤志博士より分譲)、イネミトコンドリア遺伝子 *atpA*、*atp6*、*atp9*、*cob*、*cox I* および *nad3* (農業生物資源研究所 門脇光一博士より分譲) を用いた。また制限酵素処理は、葉緑体 DNA には 4 塩基認識型の *Hae* III および *Msp* I を、ミトコンドリア DNA には 6 塩基認識型の *Bam* H I、*Eco* R I、*Eco* R V、*Hind* III、*Kpn* I、*Xba* I、5 塩基認識型の *Dde* I、4 塩基認識型の *Alu* I、*Hae* III、*Hha* I、*Mbo* I、*Msp* I、*Rsa* I および *Taq* I を用いて実施した。

なお、一部体細胞雑種クローンについてはより詳細な遺伝子分析を行うために、Kemble (1987) の方法を若干改変した以下の手順で葉緑体 DNA を抽出した。植物体若葉約 10g を 100ml の抽出バッファー (0.35M ソルビトール、50mM Tris-HCl pH8.0、5mM EDTA、0.1% BSA、15mM メルカプトエタノール、1mM スペルミンおよび 1mM スペルミジン) とともにホモジナ

イザーで破碎（5秒間2回的高速ホモジナイズ）し、8重のガーゼ、次いで1重のナイロンクロスで濾過した。濾液を1000gで10分間遠心分離し、生じた沈澱を20mlの洗浄バッファー（0.35M ソルビトール、50mM Tris-HCl pH8.0、25mM EDTA、1mM スペルミンおよび1mM スペルミジン）に懸濁した。再び1000gで10分間遠心分離し、沈澱を14mlの洗浄バッファーに再懸濁した。懸濁液を16mlの52%ショ糖と7mlの30%ショ糖（ともに洗浄バッファーに溶解）を重層した遠心チューブ内の密度勾配液の上に静かに載せ、水平ロータで25000rpm・40分間の遠心分離を行った。遠心分離により52%ショ糖と30%ショ糖の境界に生じた葉緑体バンドをピペットで静かに吸い上げて新たなチューブに移し、20mlの洗浄バッファーを加えて、さらに1500g・15分間の遠心分離を行い、葉緑体沈澱を得た。なお、以上までの操作は全て低温（4℃）下で実施した。分画した葉緑体は0.9mlの膜変性バッファー（50mM Tris-HCl pH8.0、10mM EDTA、2% サルコシルおよび0.012% プロテナーゼK）に懸濁し、37℃で1時間穏やかに振とうしてDNAを溶出させた。その後2回のフェノール-クロロホルム抽出、続いてのエタノール沈澱によってDNAを精製した。得られた葉緑体DNAは、3～4μgを制限酵素 *EcoR* Iで切断処理し、アガロース電気泳動に供した。泳動バッファーにはTAEを用い、ゲル濃度を1%として、20Vで18時間泳動した。アガロースはSeaKem ME（FMC社）を用いた。泳動後、ゲルを臭化エチジウム（0.5μg/ml）で染色して、紫外光下でバンドパターンを調べた。

結果

〔核内遺伝子〕

rDNAについてのハイブリダイゼーションの結果を図40に示した。‘シナノグリーン’、‘カルマー MR’ および ‘Lollo Rossa’ では3.6Kbと6.0kbの2本のバンドが認められ、*L. virosa*ではこれらレタス品種と同じ3.6Kbバンドのほか、3.0Kbの特異バンドが検出された。体細胞雑種はいずれも両親種のバンドを合わせ持ち、雑種性を示した。戻し交雑後代のSVB-1およびSVB-2クローン個体も同様に雑種型のバンドパターンをとった。

図41～43に3 cDNA プローブ Sc57、Sc59 および Sc63 に関してのハイブリダイゼーションパターンを示した。各プローブにおいて濃淡に差のある複数のバンドが観察され、それぞれで両親種間で多型を示す濃いバンド（メジャーバンド）の存在が確認された。

Sc57に関して‘シナノグリーン’と‘カルマー MR’は同様なバンドパターンを示し、*L. virosa*にはない1.1Kbと4.4Kbのメジャーバンドを有した。‘Lollo Rossa’は‘シナノグリーン’と‘カルマー MR’の4.4Kbバンドを欠く代わりに、やや分子量の小さい3.9Kbの固有のバンドを有した。一方、*L. virosa*では2.5Kbの特異バンドが検出された。体細胞雑種および戻し交雑クローン個体は全てレタス品種のバンドと*L. virosa*固有の2.5Kbのメジャーバンドを合わせ持った。なお、*L. virosa* および体細胞雑種ではいくつかの不明瞭なバンドの出現が認められた（図41）。

Sc59に関しては、レタス3品種が10.8Kbの固有メジャーバンドを、また*L. virosa*が種

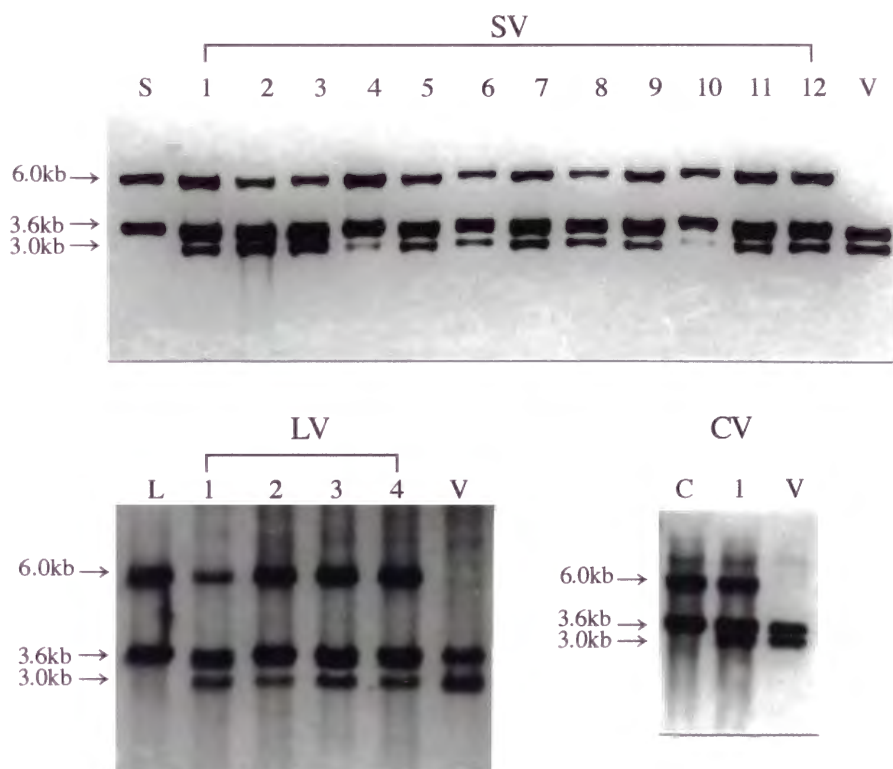


図40 体細胞雑種におけるrDNAのハイブリタ化パターン

S: 'シナノグリーン' L: 'Lollo Rossa' V: *L. virosa*

SVレーン 1: 5311 2: 7152 3: 7154 4: 8191 5: 8201 6: 9012 7: 9081
8: 9121 9: 9145 10: 10191 11: SVB-1 12: SVB-2

LVレーン 1: 7231 2: 10136 3: 10139 4: 10141

CVレーン 1: 11051

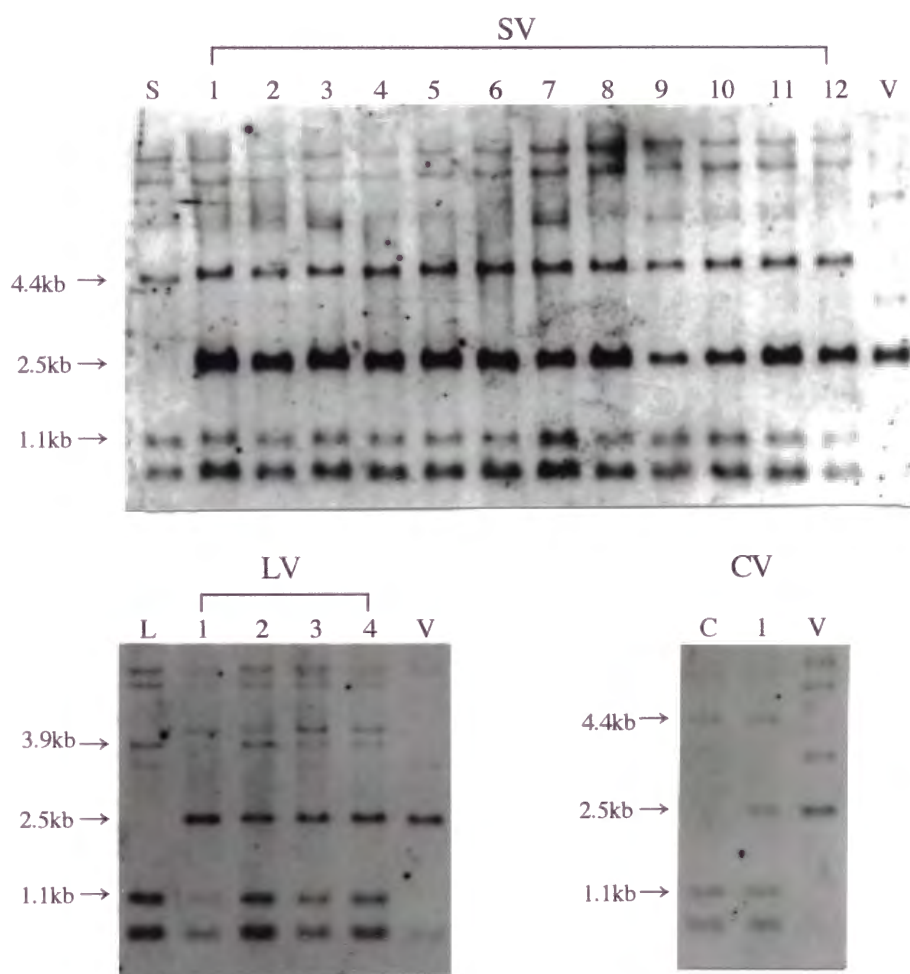


図41 体細胞雑種におけるcDNAプロブ Sc57のハイブリタ化パターン
 レン番号は図40に同じ

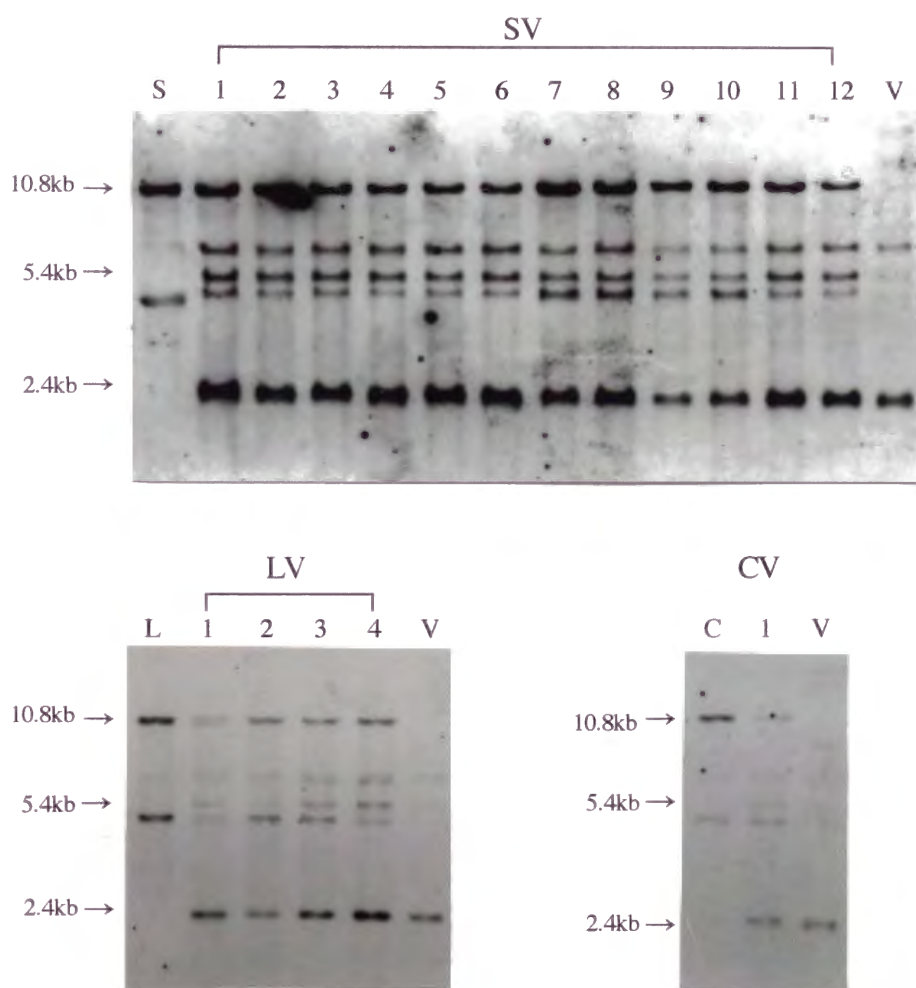


図42 体細胞雑種におけるcDNAプローブ Sc59のハイブリダイゼーションパターン
 レン番号は図40に同じ

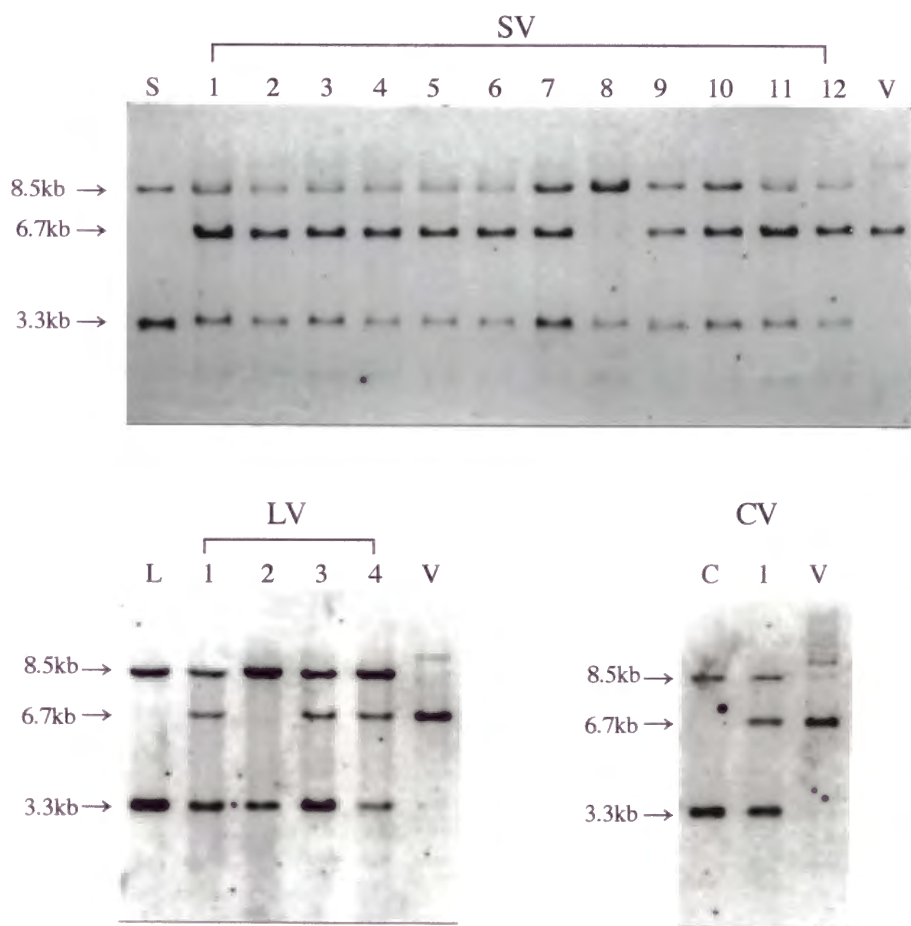


図43 体細胞雑種におけるcDNAプロファイル Sc63のハイブリタ化-シオンパターン
 レン番号は図40に同じ

特有の2.4Kbのメジャーバンドと5.4Kbの淡バンド（マイナーバンド）を有し、体細胞雑種と戻し交雑個体は全て両種のバンドを合わせ持った（図42）。

Sc63に関しては、レタス品種が3.3Kb、8.5Kbの、*L. virosa*が6.7Kbの固有バンドを有した。体細胞雑種、戻し交雑後代17クローン個体のうち、15個体は両親種のバンドを合わせ持ったが、SV-9121とLV-10136は*L. virosa*のバンドを欠き、レタスと同じバンドパターンを呈した（図43）。

なお、Sc57、Sc63に関しては、*L. virosa*でいくつかの特異的なマイナーバンドの出現が認められたが、いずれも体細胞雑種では検出されなかった。

[細胞質遺伝子]

オオムギ葉緑体DNAプローブpHVH8とpHVH10に関するハイブリダイゼーションパターンを図44と45に示した。pHVH8については両親種ゲノムDNAを*Msp* Iで切断した場合に、またpHVH10については*Hae* IIIで切断した場合に、*L. virosa*になくレタス品種のみが持つ、それぞれ1.0Kb（図44）と2.9Kb（図45）の特異バンドが検出された。他のバンドについては両種共通で、*L. virosa*に特異的な多型バンドは認められなかった。‘シナノグリーン’と*L. virosa*の体細胞雑種においては、SV-9081およびSV-9145でレタスに固有の特異バンドが検出され、両クローンともpHVH8とpHVH10に関して‘シナノグリーン’に固有の1.0Kbと2.9Kbバンドを有した。他の8クローンおよび戻し交雑後代2クローンは、その特異バンドを持たない*L. virosa*型のバンドパターンを示した。‘Lollo Rossa’と*L. virosa*の体細胞雑種は全て*L. virosa*と同じバンドパターンを示し、*L. virosa*由来の葉緑体から成ると判断された。また、‘カルマー MR’と*L. virosa*の雑種クローンCV-11051においては、‘カルマー MR’の持つ多型バンドが検出された。なお、pHVH1については両親種間でバンドパターンに差がみられなかった。

以上の葉緑体DNAプローブを用いたハイブリダイゼーション分析では*L. virosa*固有の多型バンドが認められなかったため、レタス型のバンドパターンを示す体細胞雑種の中に*L. virosa*の葉緑体が混在しているか否かを識別できなかった。この点を明らかにするために、該当するSV-9081、SV-9145およびCV-11051について抽出した葉緑体DNAを制限酵素*Eco* R Iで切断して電気泳動パターンを調べた。

両親種とSV-9081、SV-9145およびCV-11051の葉緑体DNAの*Eco* R I切断によるバンドパターンを図46に示した。‘シナノグリーン’と‘カルマー MR’は同じバンドパターンをとり、*L. virosa*は2品種と共通のバンドに加えて特異的な5 Kbの1バンドと3.8kb前後の2バンドを有した。また、レタス品種では*L. virosa*にない3.4kbのバンドが認められた。体細胞雑種については、SV-9145とCV-11051がレタス型の、SV-9081が*L. virosa*型のバンドパターンをとり、先のハイブリダイゼーションの結果を考え合わせると、前二者はレタス由来の葉緑体から成り、後者は両親種の葉緑体を合わせ持つと判断された。

ミトコンドリア遺伝子に関しては、レタス品種と*L. virosa*の全ゲノムDNAを14種類の制限酵素で処理し、6種類のプローブとのハイブリダイゼーションを実施した。しかし、い

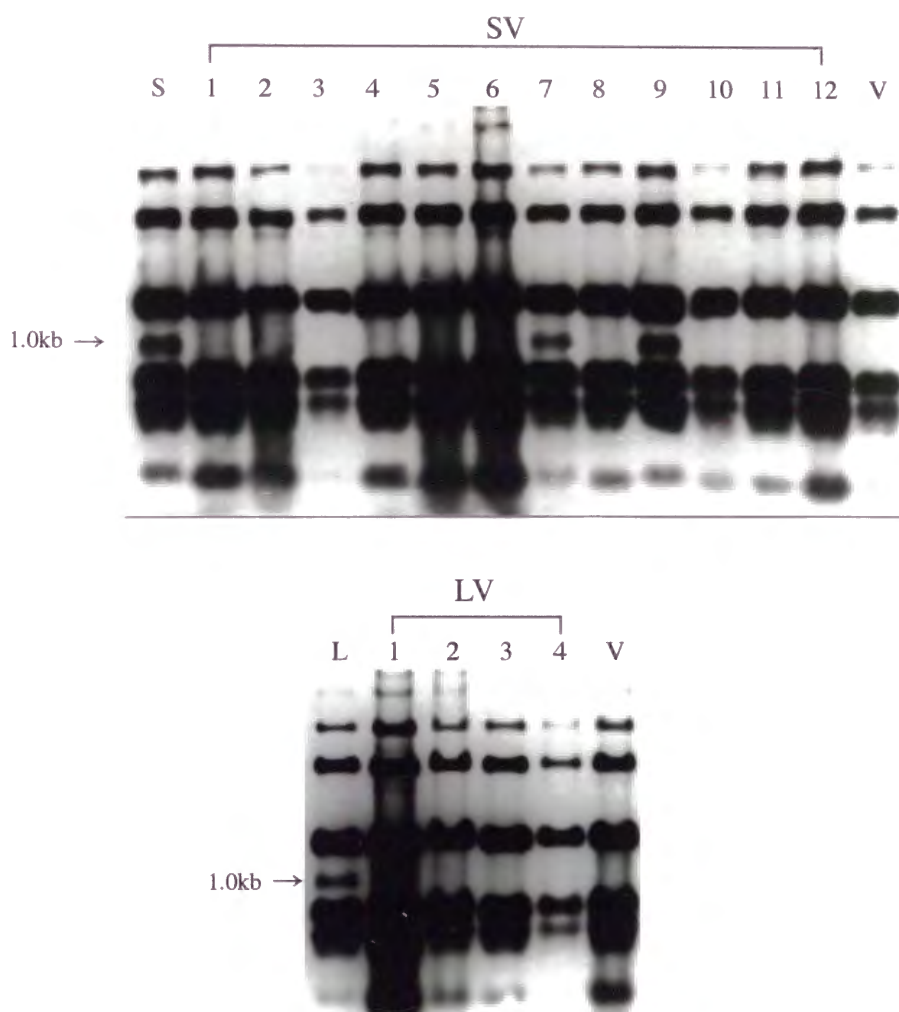


図44 体細胞雑種における葉緑体DNAクローンPHVH8のハイブリダイゼーションパターン
(*Msp* I による切断)

SVレーン 1: 5311 2: 7152 3: 7154 4: 8191 5: 8201 6: 9012 7: 9081
8: 9121 9: 9145 10: 10191 11: SVB-1 12: SVB-2
LVレーン 1: 7231 2: 10136 3: 10139 4: 10141
CVレーン 1: 11051

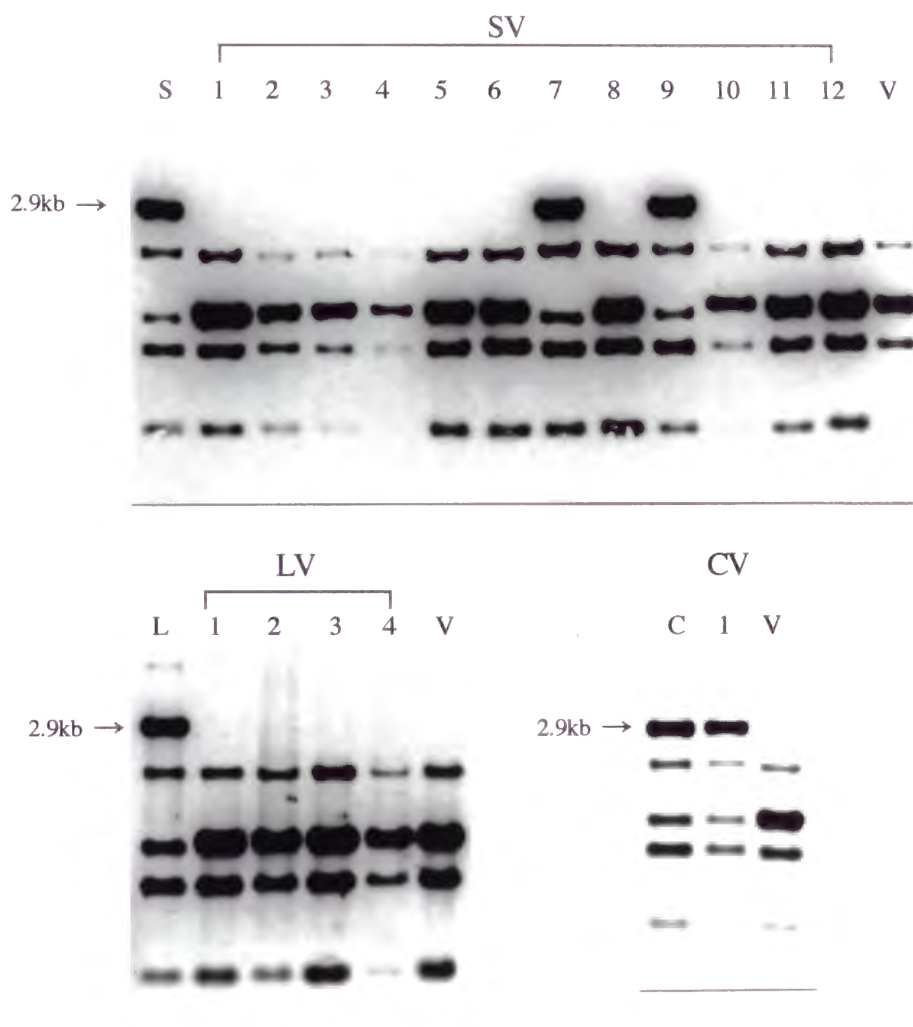


図45 体細胞雑種における葉緑体DNAクロンPHVH10のハイブリゲイションパターン
(HaeIIIによる切断)

レーン番号は図44に同じ

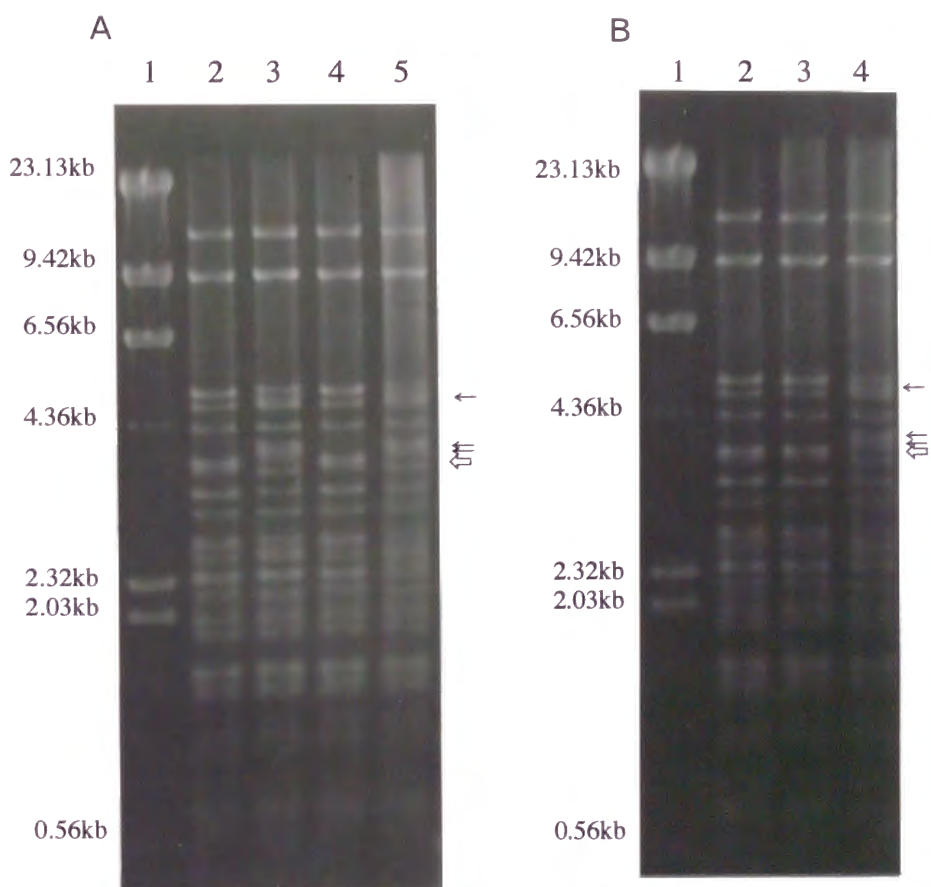


図46 体細胞雑種SV-9081、SV-9145およびCV-11051葉緑体DNAの制限酵素（*Eco* R I）切断パターン

A

レ-ン1: λ /HindIII
2: シナノク'リン
3: SV-9081
4: SV-9145
5: *L. virosa*

B

レ-ン1: λ /HindIII
2: カルマ-MR
3: CV-11051
4: *L. virosa*

⇐、← は、それぞれレタス、*L. virosa*に特異的なバンド'を指す

ずれのプローブも両親種が同一のバンドパターンを示し、多型バンドは検出されなかった。
なお、6プローブを用いて *EcoR* I、*Hind* III、*Msp* I および *Rsa* I の4種類の制限酵素で処理した体細胞雑種ゲノム DNA とのハイブリダイゼーションを行った結果、*atpA* 遺伝子のプローブに関して SV-9145 は *EcoR* I、*Hind* III および *Msp* I 切断で、それぞれ 5.2Kb、6.4Kb および 1.7Kb のバンドを欠き、両親種および他の体細胞雑種とは異なるパターンをとった（図 47）。

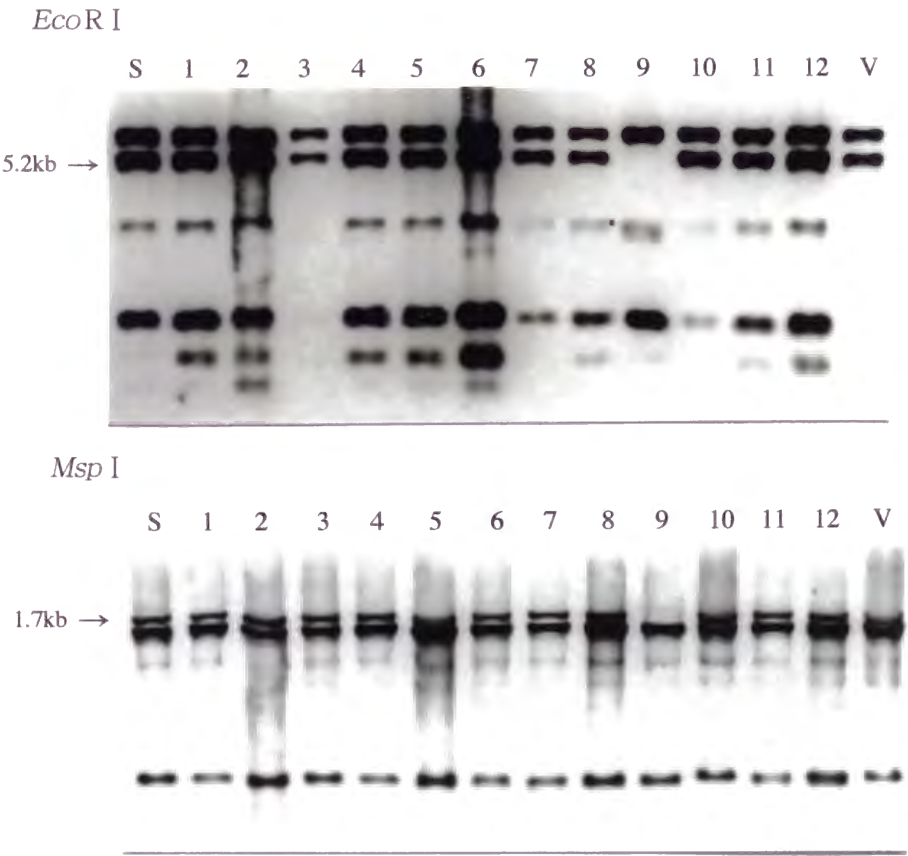


図47 体細胞雑種SVクローンにおける*atpA*遺伝子のハイブリダイゼーションパターン

レーン 1: 5311 2: 7152 3: 7154 4: 8191 5: 8201 6: 9012 7: 9081
8: 9121 9: 9145 10: 10191 11: SVB-1 12: SVB-2

考察

レタスと *L. virosa* の体細胞雑種が両種の染色体を様々な形で保有することは前章で述べた。本実験においては染色体上の異なる座位に存在するリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) および cDNA クローンを用いてハイブリダイゼーション分析を行い、体細胞雑種の核内ゲノム構成に関して遺伝子レベルでのいくつかの知見を得た。

真核生物の rDNA は多重遺伝子族を形成し、リボソーム RNA をコードする領域とスペーサー領域が交互に直列に並ぶ数百から数千コピーの反復配列構造をとる (フライフェルダー, 1989)。植物種間でスペーサー部位の塩基配列の相同性が低く RFLP が現れやすい (Saghai-Marooft ら, 1984) ことから、体細胞雑種を同定するための分子マーカーとしての利用も検討されている (内宮, 1984)。rDNA クラスターは染色体上の仁形成部 (NOR; nucleolus organizing region) に存在し、コムギ (Mukai ら, 1991)、オオムギ (Leitch & Heslop-Harrison, 1992) およびタバコ (Kenton ら, 1993) では *in situ* ハイブリダイゼーション分析により付随体染色体の二次狭窄部や特定染色体の腕部の NOR 数カ所にコピー数の異なる rRNA 遺伝子族が散在することが明らかにされている。*Lactuca* 属に関しては、レタス *L. sativa* では付随体を有する第3および5染色体に、また *L. virosa* では第5 (付随体) 染色体に NOR が存在することが報告されており (Koopman ら, 1993)、rDNA はこれら染色体領域に内包されると推測される。体細胞雑種が全て両親種に特異的なハイブリダイゼーションバンドを合わせ有した本実験の結果は、各雑種クロンのゲノム中に両親の付随体染色体がそれぞれ少なくとも1本含まれていることを示しており、戻し交雑個体の付随体染色体構成についても同様なことが言える。一方、体細胞雑種の rDNA 構造に関して、両親種にはない新たな反復配列が出現したとする *Nicotiana tabacum* と *Atropa belladonna* との属間雑種についての報告 (Borisjuk ら, 1988) もあるが、*Brassica* (Robertson ら, 1987; Rosen ら 1988) や *Solanum* (Guri & Sink, 1988) での種間雑種ハイブリダイゼーション分析に示されるように、両親種の反復配列が何ら変化することなく雑種ゲノム内に共存するケースが多いとみられる。本研究で作出した雑種個体においても rDNA の構造変異は認められず、ゲノム内で安定した構造を保持していることが示された。

レタスにおいては cDNA およびランダムゲノム DNA クローンをプローブとする RFLP 分析に基づいて遺伝子連鎖地図が作成され (Landry ら, 1987b; Michelmore ら, 1989)、マッピングされた RFLP マーカーを用いての遺伝変異解析 (Kesseli ら, 1991) が行われている。cDNA プローブはゲノム DNA プローブに比べて多型検出効率が高い (Landry ら, 1987a) ことから、これらゲノム解析研究の中で多用されており、本実験においてもレタス品種 'シナノグリーン' 由来の3 cDNA クローンをプローブとして用い、それぞれのクローンについてレタス品種と *L. virosa* 間で差のある多型バンドの存在を認めた。各クローンの染色体上の座乗位置や遺伝子座数は特定されていないが、両種でのバンドの出現は3遺伝子が各々のゲノムに内在することを示すものであり、これはレタスの RFLP マーカーの74%以上が *L. virosa* で対立バンドを欠いたとする Kesseli ら (1991) の報告とは傾向を異にする結果である。この理

由として、Kesseli らが単一バンド型 RFLP を検出するプローブを用いているのに対し、本実験では複数のバンドを検出する重複遺伝子型プローブを使用していることがあげられる。種の分化過程で保存あるいは修飾された当該遺伝子とその周辺領域が両種ゲノム内に長さの異なる配列をもって重複して散在し、多型が生じたものと推定される。いずれの cDNA プローブに関しても体細胞雑種の大半は両親種の特異メジャーバンドを合わせ持ち、その遺伝的雑種性が確認されたが、1 プローブ Sc63 については 2 体細胞雑種個体が *L. virosa* に特異的なバンドを欠き、レタス型のバンドパターンを示した。このことはこれら個体における Sc63 の座乗する *L. virosa* 染色体対の欠失を意味するが、前章での *L. virosa* マーカー染色体の欠落傾向とも関連し、特定の染色体対の脱落性を暗示する結果として興味深い。なお、染色体の部分的欠失の可能性を含め、ゲノム構成およびその構造の詳細に関しては染色体分染に基づく核型分析や他の連鎖マーカーを用いての遺伝解析により明らかにする必要がある。

体細胞雑種の細胞質ゲノムの挙動に関してはこれまで様々な植物種で遺伝子レベルでの解析がなされ、葉緑体とミトコンドリアゲノムの融合細胞から再生植物体への伝達様式および雑種個体における両ゲノムの構造について数多の知見が得られている。

両親種細胞質ゲノムの体細胞雑種への伝達についてはいくつかのパターンが考えられるが、分裂細胞へのゲノム分配は無作為的に行われるため、雑種個体のゲノム構成は一定していない。例えば体細胞雑種への葉緑体分配をみると、本実験結果にも示されるように、両親の一方が脱落し、片方のゲノムのみが残存する傾向が顕著であり、両親ゲノムが共存するケースは少ない。両親ゲノムの残存比率については、ほぼ同率とする *Brassica* (Sundberg ら, 1987)、*Solanum* (Pehu ら, 1989) および *Lycopersicon* (Derks ら, 1991) における種間雑種での例や、偏りがあるとする *Brassica napus* と *Eruca sativa* の属間雑種 (Fahleson ら, 1988)、*Brassica* 種間雑種 (Sjödín & Glimelius, 1989) および *Solanum* 種間雑種 (Guri & Sink, 1988) での例がある。ミトコンドリアについても同様に、体細胞雑種の大半が片親のゲノムのみを有し、葉緑体とは独立に分配されることが報告されている (Kemble ら, 1988; Derks ら, 1991)。一方の親細胞由来の細胞質ゲノムが脱落する原因としては、核ゲノムからの選択圧、細胞分裂に伴うランダムな分配、伝達能の差 (林, 1987) あるいはゲノム複製効率の差 (Fahleson ら, 1988) が考えられ、また供試材料、融合状態あるいは再生条件等の要因もゲノム挙動に影響を及ぼすものとみられる。本実験の葉緑体 DNA 分析では、体細胞雑種 15 クローン個体のうち、レタス型が 2、*L. virosa* 型が 12 および共存型が 1 となり、*L. virosa* 型の比率が 8 割を占めた。このような分配の偏りは栽培型と野生型の葉緑体ゲノムが細胞内で必ずしも中立的関係にないことを示唆するが、上記のゲノム伝達に関与するいずれのメカニズムにより偏分配が誘起されるかは明らかでない。

細胞融合によるゲノム構造の変化に関して葉緑体とミトコンドリアでは様相が異なる。葉緑体については、*Nicotiana* 種間雑種で両親ゲノム間での組換えが (Medgyesy ら, 1985)、また *Brassica* 種間雑種でゲノムの再配列が (Ölin-Fatih ら, 1996) 生じたとする事例もあるが、多くの場合体細胞雑種でのゲノム構造の変化は認められず (Belliard ら, 1978 ;

Matthews ら, 1985 ; Rosen ら, 1988 ; Kemble ら, 1988; Pehu ら, 1989 ; Derks ら, 1991 ; Sundberg ら, 1987)、ここで作出されたレタス体細胞雑種においても両親にない新たな葉緑体 RFLP バンドの出現はなく、親ゲノムの構造を安定した形で保持していることが示された。一方、ミトコンドリアについては、*Nicotiana* (Belliard ら, 1979, ; Galun ら, 1981)、*Brassica* (Chetrit ら, 1985 ; Vedel ら, 1986 ; Robertson ら, 1987)、*Lycopersicon* (Derks ら, 1991)、*Petunia* (Boeshore ら, 1983 ; Rothenberg ら, 1985) および *Daucus* (Ichikawa ら, 1987) など様々な植物種での体細胞雑種において両親ゲノム間での組換えが報告されており、異種ゲノム間の組換えによる構造変化は雑種細胞内で高頻度に生じているものと推察される。6 ミトコンドリア DNA プローブに関してレタス栽培種 (*L. sativa*) と野生種 *L. virosa* 間で制限酵素切断多型が認められなかった本実験の結果は、両種ミトコンドリアゲノムが極めて類似した構造をとることを示唆し、その高相同性故に雑種細胞における両親種ゲノムの挙動をとらえることが困難であった。なお、1 体細胞雑種クローンで認められた *atpA* 遺伝子の欠失型変異は、両親種ゲノムの相互作用に起因するとみることもしるが、パレイショプロトプラスト由来個体における欠失または添加型の (Kemble & Shepard, 1984) あるいはコムギ未熟胚由来のカルスにおける欠失型の (Rode ら, 1987) ミトコンドリア DNA 変異発生事例を考量すると、脱分化過程で生じた培養変異である可能性も十分考えられる。また、3 種の制限酵素切断でいずれも 1 バンドのみが消失し、新たなバンドの出現がみられなかった変異パターンからは、構造変異がサブゲノミック分子の欠失に基づくものと判断される。

総合考察

1. *Brassica* 属野菜における半数体の育成とその育種的利用

Brassica 属植物における薬培養の発展は、花粉からの安定的な胚様体誘導を可能とした Keller らの一連の研究成果 (Keller ら, 1975; Keller & Armstrong, 1977, 1978, 1979) に負うところが大きい。彼らが確立した薬培養法は *Brassica* 種全般に適用可能で、その汎用性と安定性からアブラナ科作物での半数体育種を実用化段階へと導き、新たな育種体系構築への道を開いた。本研究ではハクサイおよびキャベツ等の *Brassica* 属野菜を対象に、胚様体誘導のための薬培養条件の検討を行い、培地組成および培養温度等に関していくつかの知見を得た。また、ハクサイの薬培養により作出した倍加半数体については、根こぶ病等の耐病性育種への利用を図り、その有効性を検証した。

(1) 薬培養法

薬培養の成否に関与する主な要因としては、親植物体の遺伝子型とその育成条件、花粉発育ステージ、培地組成および培養温度・光条件があげられる。Keller らの培養法は、培地中の糖 (ショ糖) 含量を 10% という高濃度に設定し、30~35℃ での高温前培養 (1~3 日間) を適用した点に大きな特徴がある。本研究においても基本的には Keller らの培養法に従ってハクサイ (*B. campestris* var. *pekinensis*)、チンゲンサイ (*B. campestris* var. *chinensis*) およびキャベツ (*B. oleracea* var. *capitata*) の薬培養を実施し、それぞれの供試材料で胚様体形成を導いた。諸要因の影響に関しては、花粉発育ステージ、培地成分および高温前培養期間について、一定の範囲に適条件があることが明らかとなり、概ね、各要因の適条件の組合せにより効率的な胚様体誘導が可能と考えられた。

同一種にあっても遺伝子型により薬培養反応は異なり、胚様体形成率に関しての品種間差異が *B. oleracea* (Ockendon, 1985; Arnison & Keller, 1990; Phippen & Ockendon, 1990) および *B. campestris* (Sato ら, 1989) で報告されている。本研究においてもハクサイの薬培養で胚様体形成率の著しい系統間差が認められた。*Brassica* 花粉 (小孢子) からの胚様体形成が遺伝的支配下にあることは、Sequin-Schwartz ら (1983) と Siebel & Pauls (1989) の胚形成能の後代伝達に関する報告からも明らかであり、高胚形成能が複数の遺伝子に支配される部分優性形質であるとの報告 (Ockendon & Sutherland, 1987) もなされている。しかし、関与遺伝子数、遺伝子間の相互作用および胚形成能の遺伝については多くが未解明の状況にある。広範な遺伝子型の素材での半数体の効率的作出と育種利用を図る上で、高胚形成能因子の特定とその遺伝性の解明は重要で、今後 *Brassica* 各種において検討を要する。

形成された胚様体については、発育停止して枯死するものや異常肥大を呈したり奇形となるものが多く、糖濃度と生長調節物質濃度がこれら異常発育に関与していることが示唆された。正常な発育を確保する上で、比較的早い胚発育ステージでの低糖濃度培地への移植が重要と考えられた。胚発育に関しては同じ薬内においても異なるステージの胚様体が混在する

など同調性が低いことから、全て同様な培地条件で発育を制御して正常な植物体へと導くことは困難であり、胚様体からの植物体再生効率の向上が課題として残された。

近年、*Brassica*植物種でも単離花粉の培養により直接的に胚様体を誘導することが可能となり（Lichter, 1982; Chuong & Berversdorf, 1985; Lichter, 1989）、作業効率がよい花粉培養は省力的で効果的な半数体作出手法として多用されている。花粉培養では体細胞組織の化学的・物理的影響が除去でき、条件によっては葯培養を上回る胚様体形成と植物体再生率を達成することが可能である（Siebel & Pauls, 1989）。しかし、胚様体分化に対する葯壁等の看護効果も無視できず（Heberle-Bors, 1985）、特に胚形成能の低い材料では葯培養が好結果をもたらす場合も多い。従って、より効率的な半数体の作出には供試材料に応じた培養法の使い分けが重要で、状況によっては葯・花粉両培養法の併用も必要であろう。

（２）再生植物体の特性

培養葯中に形成された胚様体はその発生状況からいずれも花粉起源であると判断されたが、ハクサイの胚様体から再生した植物体の染色体数については半数性から4倍性までと多様であった。倍数化は小孢子が分裂する過程での自然倍加によるもので、2倍体が半数以上を占めた本研究結果および他の *Brassica* での同様な報告事例（Keller ら, 1975; Wenzel ら, 1977; George & Rao, 1982; Chiang ら, 1985; Ockendon, 1986）からは、2倍性が最も安定した倍数性レベルであることがうかがわれる。染色体の倍加が仮に花粉遺伝子型の影響を受けず、機会的に誘発されるとすれば、自然倍加はコルヒチン等による人為的倍加処理を省略できる点で半数体の育種利用上はむしろ望ましい現象と言える。

葯培養により育成した倍加半数体については、培養変異の発生により一部遺伝形質がヘテロ性を示す場合もある（Hoffmann ら, 1982）が、理論的には遺伝的に完全に固定した状態にあり、自殖後代の諸形質の表現型は均一となることが予想される。実際、ハクサイの葯培養により育成した倍加半数体は、その自殖後代が形態および生育特性に関して均一で、主要形質については遺伝的に固定していると判断された。また、ホモ化に伴い自家不和合性の付与もはかられることから、倍加半数体は直接 F_1 親としての利用が可能であり、その固定度の高さ故に交雑組合せによっては強いヘテロシスが発現するものと推察される。

（３）倍加半数体の育種の利用

半数体育種における優良個体の選抜効率は、目標形質に関与する遺伝子数とその作用性により異なる。少数遺伝子に支配される劣性発現形質については交雑分離集団に比べて倍加半数体集団での選抜が有利で、多数遺伝子が関与し、遺伝子間の連鎖の程度が強い場合には倍加半数体を用いての選抜は効率が劣るとされる（米澤, 1985）。通常の育種においては目標形質のみならず他の諸形質にも配慮した総合的評価により優良個体選抜が行われることから、多数因子を想定しての育種規模の策定が必要となる。また、他殖で自家不和合性のアブラナ科野菜では倍加半数体の自殖後代の育成に蕾受粉等の交配労力を要し、扱える系統数に制約

があることを勘案すると、半数化は数回の選抜を経た世代に適用するのが有効と考えられる。ハクサイ根こぶ病抵抗性育種への薬培養の適用に際しては、このような考え方に基づいて選抜過程にある系統を供試材料とした。その結果、比較的少数の育成倍加半数体系統の中に優れた特性を有するものが存在し、選抜世代での半数化がより実用的であることが示された。

(4) 倍加半数体を用いた遺伝解析

倍加半数体系統は完全固定系統として諸形質の遺伝解析にも有効に活用できる。本研究においては薬培養により育成したハクサイの倍加半数体系統を用いて根こぶ病抵抗性の遺伝解析を行い、根こぶ病抵抗性との関連の中で RFLP マーカーによる遺伝子連鎖地図の作成を試みた。根こぶ病抵抗性に関しては、非分離世代における表現型の変動が全て環境変異に基づくものと解されるため、ホモおよびヘテロ状態での抵抗性遺伝子の作用力の評価が確実にでき、また菌の複雑な病原性に対応する複数の主働抵抗性遺伝子の相互関係についても一部明らかにすることができた。

RFLP 解析に基づく遺伝子連鎖地図の作成に際しては自殖固定系統を両親とするケースが多いが、親系統にわずかに残っているヘテロ性に起因すると推定される異常な RFLP 分離パターンの発生により解析に不都合を生ずる事例 (Landry ら, 1991) もみられる。倍加半数体系統を用いたここでの解析では、説明に苦慮するような RFLP 分離は認められず、連鎖地図の作成を円滑に進めることができた。このように倍加半数体は遺伝子レベルでもほぼ完全に固定した状態にあることが確認され、遺伝解析材料としての優位性が検証された。

2. レタスにおける種間体細胞雑種の育成

体細胞雑種は、プロトプラストの作成、細胞 (プロトプラスト) 融合、雑種細胞の選抜および雑種細胞からの植物体再生の過程を経て作出される。対象植物や組合せる両親種によりそれぞれの過程での適実験条件は異なることから、体細胞雑種を効率的に育成するには、供試植物種に適合した個々の実験系を確立し、それらを体系的に組み立てる必要がある。本研究ではレタスと腐敗性病害抵抗性の野生種 *L. virosa* を供試材料とした。両種の細胞融合に関しては前例がなく、各過程の実験系について検討を行う中でいくつかの新たな知見が得られた。

(1) プロトプラスト培養法

プロトプラスト培養は細胞融合の基盤を成す実験系であり、安定した培養系の構築は体細胞雑種育成の基本要件とされる。単細胞 (プロトプラスト) から植物体再生に至る培養過程には、プロトプラストの活性、培地組成、培養方法、培養密度および培養温度・光条件などの要因が関与し、効率的培養系の構築のためにはこれらの要因について個別的な検討が必要となる。

レタスにおいては Berry ら (1982) と Engler & Grogan (1982) によるプロトプラスト培養

に関する最初の報告からもうかがい知れるように、初期培養におけるプロトプラストの分裂とコロニー形成を導くための適培地および培養条件の究明が培養系成立の鍵を握る。レタス細胞は分裂を続ける過程で種々の代謝物質を放出し、これらの培地中に拡散した産生物質により細胞の分裂・生育が抑制され (Berry ら, 1982)、後の茎葉分化にも影響が生じる (Engler & Grogan, 1982)。このことから、プロトプラストの初期培養の成否は、これら産生物質の影響をいかに抑えるかにかかっている。Engler & Grogan (1982) はこのようなレタス培養細胞の特殊性を考慮し、培地組成、培養方法および細胞密度に検討を加えて、簡易で効率的な培養系を確立した。彼らの初期培養法の特徴としては、代謝物質の拡散による悪影響を和らげるために固形培地に葉肉プロトプラストを低密度で包埋して培養するビーズ培養法を適用したこと、培地の塩類濃度を抑えたことおよび培地成分に緩衝剤 (コハク酸ナトリウム) を加えたことがあげられる。それらの汎用性は Michelmores & Eash (1986) および Nishio ら (1988) によっても確認されている。

本研究では Engler & Grogan (1982) の開発した培養系が汎用的で安定性があると判断し、初期培養培地については基本的には彼らの培地組成に従い、培養方法としてはプロトプラストをアガロースに包埋して液体培地上に浮遊させるアガロース・ビーズ培養法を採用した。本研究で用いた初期培養法はレタスおよび類縁種に適用可能で、*L. virosa* を除く '*serriola* グループ' 種の葉肉プロトプラストから安定的にコロニー形成を導くことができた。また、アガロース・ビーズ培養法によれば液体培地の交換が容易に行えるため、比較的高密度の培養にも対応でき、培地の早期更新により形成コロニー数の増加が図られた。再分化培養におけるプロトプラスト由来カルスからの茎葉分化は、初期培養培地のオーキシンとサイトカイニン濃度の影響を受けることが判明し、安定的に茎葉分化を導くには、再分化培地での両物質濃度を相対的に下げる必要があると推測された。本研究で確立した培養系によれば、レタス類プロトプラストの培養が安定的に行えるほか、40~50 日という短期間でプロトプラストからの植物体再生が図られる。従ってこの方法は細胞融合以外にも細胞選抜やエレクトロポレーションによる遺伝子組換えなどプロトプラストを用いる様々な実験系に広く活用できるものと考えられる。

(2) 体細胞雑種の選抜法

体細胞雑種の効率的育成には、目的とするヘテロカリオン細胞のみを選抜できる雑種細胞選抜法が不可欠である。上述のプロトプラスト初期培養培地において、レタスプロトプラストは分裂できるが *L. virosa* プロトプラストは分裂できないことを利用して、ここでは代謝阻害剤による片側 (レタス) 不活化選抜法を適用し、効率的に雑種個体を得ることができた。このように不活化選抜法は遺伝的・生理的マーカーを持たない植物材料間の細胞融合での雑種細胞の選抜に有効であり、異なる作用性を有する代謝阻害剤を併用する (Nehls, 1978) ことで、より汎用性のある選抜法に成り得ると考えられる。なお、近年雑種細胞の選抜マーカーとして、遺伝子組換えにより導入した外来遺伝子の利用が試みられており、レタスにおい

でも導入したカナマイシン耐性 (NPT II) 遺伝子をマーカーとした雑種選抜が行われている (Chupeau ら, 1994)。レタスではアグロバクテリウム感染法 (Michelmore ら, 1987) あるいはエレクトロポレーション法 (Chupeau ら, 1989) を用いて外来遺伝子導入を比較的容易に行うことができるため、特定の選抜マーカーを持たない融合組合せでは外来遺伝子マーカーの利用も一考に値しよう。

(3) 体細胞雑種の特性

育成した体細胞雑種の染色体数には幅があり、その構成も多様であることが推察された。ゲノムバランスのとれていない異数性の個体では草勢が弱く、葉が奇形となるなど様々な生育異常を生じ、一部染色体の重複や欠失が諸形質の表現型に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。また、レタス品種 'シナノグリーン' と *L. virosa* 間の正4倍性雑種個体 (複2倍体) に 'シナノグリーン' の花粉を授粉して得た戻し交雑個体の染色体構成は *L. sativa* $2x + L. virosa x$ と推定された。体細胞染色体の GISH シグナルの発生状況や減数分裂時の染色体対合状況からは、両親種染色体が特定部位で共通の遺伝子構造をとることがうかがわれた。戻し交雑個体の不稔の原因は、ゲノム構成の偏りと両親種染色体の部分的相同性に起因する異常な減数分裂およびその結果生じた生殖細胞の交雑能力の欠如にあると考えられた。従って染色体倍加や戻し融合等の手段を用いての稔性回復および後代獲得が今後の課題として残された。

L. virosa の有する腐敗病および軟腐病抵抗性は体細胞雑種において優性的に発現し、*L. virosa* 基本ゲノムの存在が安定した抵抗性を支えていることが明らかとなった。しかし、両病害に関しては複数の抵抗性因子の関与が想定されること、*L. virosa* 染色体とレタス染色体とは相同性が低いことから、仮に体細胞雑種の稔性が確保されたとしても、形質改善を進めていく過程での安定した抵抗性の維持には困難が予想される。今後、体細胞雑種および戻し交雑個体の後代育成を図る中で、ゲノムの挙動と病害抵抗性発現との関係を明らかにし、強抵抗性個体選抜の可能性を探る必要がある。

植物の細胞質に存在するミトコンドリアおよび葉緑体遺伝子は母性遺伝をするため、異なる遺伝子型の細胞質ゲノムが有性生殖によって1個体内に共存する機会はない。細胞融合によれば1細胞内に両親の細胞質ゲノムを共存させることが可能となり、細胞質遺伝変異の拡大と異ゲノム間の相互作用に基づく新たな形質発現が期待される。細胞質雑種の育種的利用に関しては、異細胞質ゲノムを組合せて細胞質雄性不稔個体を作出し、品種育成に結びつけたタバコの例 (Kubo ら, 1988) がある。本研究での葉緑体雑種個体の作出は、レタスにおける細胞質雑種利用への手がかりを与えるものである。また、出現した両親 (レタス、*L. virosa*) 型と雑種型の3種の体細胞雑種葉緑体のゲノム構成パターンは細胞質ゲノム制御の可能性を示唆する。

摘 要

本研究はハクサイおよびキャベツ等のアブラナ科野菜およびキク科のレタス (*Lactuca sativa*) を対象に、組織・細胞培養を利用したゲノム制御とその耐病性育種への応用について検討したものである。アブラナ科 *Brassica* 属野菜においては薬培養を用いて半数体の作出を試み、ゲノム削除を通して遺伝的に固定された倍加半数体の耐病性育種への利用を検討した(第1～3章)。また、レタスにおいては腐敗性病害抵抗性野生種 *L. virosa* との細胞融合を行い、作出した体細胞雑種について形態等の表現型とゲノム構成を調べ、異種ゲノム添加による耐病性付与の可能性を検討した(第4～6章)。

以下に研究の概要を章ごとに述べる。

1. *Brassica* 属野菜における半数体の育成

- (1) ハクサイ (*B. campestris* var. *pekinensis*)、チンゲンサイ (*B. campestris* var. *chinensis*) およびキャベツ (*B. oleracea* var. *capitata*) について薬培養を実施し、それぞれで花粉起源の胚様体を得た。
- (2) 胚様体形成を効率的に導くために、花粉发育ステージと培地・培養条件の影響を検討した。花粉发育ステージについては1核前～中期が胚様体形成に適し、花卉長と葯長の比をステージ判定の指標に、概ね花卉長／葯長が1/4～1/2の蕾を使用することで好結果を得た。基本培地としては改変B5培地が適したが、その構成要素である無機塩類濃度が胚様体形成に影響を及ぼすことが判明し、アンモニア態窒素については、標準濃度よりやや高めに設定するのがよいと推察された。糖濃度の影響に関しては、高濃度で胚様体形成が促進され、ハクサイではショ糖濃度10% (0.29M) で最多の胚様体を得た。糖の種類ではショ糖以外にブドウ糖と果糖の有効性が認められ、いずれも0.2～0.3Mが適濃度と推定された。オーキシンおよびサイトカイニンの両生長調節物質は胚様体形成に影響を及ぼしたが、特にオーキシンの効果は大きく、品種・系統間でその濃度効果に差が認められた。生長調節物質の種類および濃度による効果の差は供試材料の内生ホルモンレベルに起因するものと推察され、胚様体の効率的誘導には材料の遺伝子型あるいは育成状況に応じた濃度設定が重要と考えられた。
- (3) 形成された胚様体は、发育停止して枯死するものや子葉や胚軸が異常肥大を呈したり奇形となるものが多く、培地中の糖および生長調節物質がこれら異常发育に関与していることが示唆された。胚様体の正常な发育を確保するためには心臓型胚前後の比較的早いステージでの生長調節物質無添加の低糖濃度培地への移植が有効であった。
- (4) 培養葯中に形成された胚様体は、その発生状況から花粉起源と判断されたが、ハクサイにおいては胚様体から再生した植物体のうち約1/3が半数体で、自然倍加の2倍体が半数以上を占めた。また少数ではあるが、3倍体と4倍体の出現も認められた。半数体は栄養器官および生殖器官ともに生育量が小さく、稔性を欠いた。倍加半数体はいずれも自家不和合性を示し、その自殖後代の諸形質の表現型やRFLP解析結果から、遺伝的にはほぼ完全に固定した

状態にあると推定された。

2. ハクサイの耐病性倍加半数体系統の育成

- (1) ハクサイ根こぶ病抵抗性系統 T136、CRK-1 および黄化病・根こぶ病複合抵抗性系統 E0C-4 の薬培養を実施し、耐病性半数体の作出を試みた。供試3系統のいずれもが胚様体を形成し、それぞれから倍加半数体を得た。
- (2) 育成した倍加半数体系統は親系統の根こぶ病抵抗性因子をホモに有したが、親系統の遺伝的背景を反映して異菌系に対して多様な抵抗性反応を呈した。すなわち、T136 由来の倍加半数体系統 T136-8 およびキャベツとの種間雑種に T136-8 を戻し交雑親として用いて育成された E0C-4 系統由来の倍加半数体系統 0C-86 は、根こぶ病空海寄生菌に対して非抵抗性で、望月菌に対しては1優性因子支配型の抵抗性を示した。一方、CRK-1 系統由来の倍加半数体系統 K10 は望月菌および空海寄生菌に対して抵抗性を示した。しかし、罹病性系統との交雑後代での抵抗性分離は複雑で、1主働因子の効果のみで抵抗性発現を説明することが困難であった。0C-86 系統は根こぶ病抵抗性に加えてキャベツ由来の発病遅延型の黄化病抵抗性を有した。黄化病抵抗性に関しては、複数因子の関与が推定され、それら因子がヘテロ状態になると抵抗性が著しく弱まることが明らかとなった。従って、F₁ 化に際して安定した黄化病抵抗性を確保するためには、両親系への抵抗性因子の付与が必要と考えられた。

3. 倍加半数体系統を利用したハクサイの遺伝子連鎖地図の作成

- (1) ハクサイ根こぶ病抵抗性倍加半数体系統 T136-8 と球内橙黄着色性倍加半数体系統 Q5 を親系統に用いて、後代分離集団での両有用形質の遺伝解析を実施した。T136-8 の抵抗性は上述のように1優性主働因子の発現効果で説明され、また Q5 系統の橙黄着色性は分離世代での着色状況から、単一の劣性因子支配形質と判断された。
- (2) プローブとして用いた 286 の cDNA クローンに関しての両親系統 T136-8 と Q5 間の RFLP 出現率は、*Bam* H I、*Eco* R I、*Hind* III、*Hae* III 切断で、それぞれ 3.6、12.2、10.5、11.2% であり、全体では 19% であった。T136-8 と Q5 間で多型を示した 53 クローンの連鎖解析により 69 の RFLP 遺伝子座が決定された。
- (3) F₂ 集団での遺伝解析を基にした RFLP マーカー、根こぶ病抵抗性および橙黄着色性遺伝子のマッピングにより 10 連鎖群から成る全長 735cM の遺伝子連鎖地図が作成された。根こぶ病抵抗性主働遺伝子座 (*CRa*) は第3連鎖群に属し、RFLP マーカー HC352b および HC181 がそれぞれ 3cM と 12cM の距離に近接した。橙黄着色性遺伝子座 (*oy*) は第1連鎖群の端部に位置し、RFLP マーカー HC30b、HC173 および HC56 が 17~19cM の距離に隣接した。

4. レタスにおける種間体細胞雑種の育成

- (1) 細胞融合の前提となるプロトプラスト培養系の確立を図るために、レタス葉肉プロトプラストを供試して培地・培養条件の検討を行った。初期培養培地としては浸透圧調節にシヨ

糖を用い、緩衝剤のコハク酸ナトリウムを加えた低無機塩濃度のMS培地が適した。また、プロトプラストをアガロース培地に包埋して液体培地上に浮遊させるアガロース・ビーズ培養法の適用により、安定的にコロニー形成を導くことができた。再分化培養におけるプロトプラスト由来カルスからの茎葉分化は、初期培養培地のオーキシンあるいはサイトカイニン濃度の影響を受けた。効率的に茎葉分化を導くには、再分化培地での両生長調節物質濃度を相対的に下げる必要があると推察された。培地中のプロトプラスト密度に関しては、高密度でコロニー生育の停止と茎葉分化の低下が認められ、細胞分裂・形態形成への細胞産生物の関与が示唆された。コロニー形成および茎葉分化を考慮した培養密度としては $1 \times 10^4/\text{ml}$ が適当と判断された。

- (2) 電気融合法によりレタスと野生種 *L. virosa* のプロトプラスト融合を試みた。電気処理強度が強いほど細胞融合率は高まる傾向にあったが、細胞損傷も増大した。融合率および細胞損傷への影響を考慮すると、細胞の接近・接触を誘導するための交流電界強度としては150V/cmが、また細胞融合を誘起するための直流電界強度としては1.5~2KV/cm (30 μ s) が適当と推定された。
- (3) 初期培養培地においてレタスプロトプラストは分裂できるが、*L. virosa* プロトプラストは分裂できないことから、レタスプロトプラストに代謝阻害剤ヨードアセトアミド (IOA) 処理を加える不活化選抜法の適用により効率的に雑種個体を得ることができた。レタス細胞の分裂を完全に抑制する IOA 閾濃度は5~10mMであったが、エスケープ細胞の出現を防止するためには、完全不活化最低レベルよりやや高めでの濃度処理が有効と考えられた。

5. レタスの体細胞雑種の一般特性、耐病性および染色体構成

- (1) 電気融合および不活化選抜により、レタス品種 'シナノグリーン'、'Lollo Rossa' あるいは 'カルマーMR' と *L. virosa* との間に、それぞれ16、4、1体細胞雑種個体が得られた。体細胞雑種はいずれも両親種の特性を合わせ持ち、葉形、葉色および葉質について概ね中間的な特性を示した。
- (2) 体細胞雑種個体の染色体数は $2n=28\sim53$ と幅があり、うち両親種のゲノム(ともに $2n=18$)を完全な形で合わせ持つ複2倍体($2n=2x+2x=36$)が約半数を占めた。これら個体は草勢が強く、両親に比べて旺盛な生育を示した。残りの個体については異数体であったが、 $2n=28$ の4倍性低異数体や $2n=40$ 以上の異数体の多くは葉が奇形となるなどの生育異常を生じた。染色体数およびその構成内容にかかわらず体細胞雑種はいずれも稔性を欠いた。
- (3) レタス品種 'シナノグリーン' と *L. virosa* の間の複2倍性体細胞雑種個体に 'シナノグリーン' を戻し交雑して2個体を得た。戻し交雑個体の染色体数は $2n=27$ で、核型観察とGISH分析の結果から、その構成はレタス $2x + L. virosa \times$ と推定された。戻し交雑個体はいずれも稔性を欠き、染色体倍加や戻し融合等による後代獲得が今後の課題として残された。
- (4) *L. virosa* の有する腐敗病と軟腐病抵抗性は体細胞雑種において優性的に発現した。両病害に対する抵抗性には複数因子の関与が想定されるため、今後、後代育成を図る中でゲノ

ム挙動と抵抗性発現の関係を明らかにし、強抵抗性個体選抜の可能性を探る必要がある。

6. レタスの体細胞雑種のアイソザイムおよび遺伝子分析

- (1) 体細胞雑種および戻し交雑後代17個体について、アイソザイム分析および核内・細胞質（葉緑体、ミトコンドリア）遺伝子のRFLP分析を実施した。エステラーゼとロイシンアミノペプチダーゼの2種類のアイソザイム分析ならびにイネ rDNA とレタス3 cDNA をプローブにした核内遺伝子分析では、体細胞雑種および戻し交雑個体は概ね両親種のバンドパターンを合わせ持ち、分子レベルでの雑種性が確認された。一部体細胞雑種は、1 cDNA プローブ Sc63 に関してレタス型のバンドパターンを呈し、当該遺伝子が座乗する *L. virosa* の染色体の欠落が示唆された。
- (2) 葉緑体に関しては、レタス型のゲノム構成をとるものが2個体、*L. virosa* 型が14個体、両種共存型が1個体であった。ミトコンドリア遺伝子に関しては、供試6プローブによっては両親間に多型が検出されず、レタスと *L. virosa* ゲノムが極めて類似した構造をとることが示唆された。1体細胞雑種において、サブゲノミック分子の欠失に基づく、*atpA* 遺伝子の構造変異が認められた。

引用文献

- Al-Atabee J.S., B.J. Mulligan & J.B. Power, 1990. Interspecific somatic hybrids of *Rudbeckia hirta* and *R. laciniata* (Compositae). Plant Cell Rep. 8: 517-520.
- Apuya N.R., B.L. Frazier, P. Keim, E. J. Roth & K.G. Lark, 1988. Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) merrill. Theor. Appl. Genet. 75: 889-901.
- Arnison P.G. & W.A. Keller, 1990. A survey of the anther culture response of *Brassica oleracea* L. cultivars grown under field conditions. Plant Breeding 104:125-133.
- Arus P., S.D. Tanksley, T.J. Orton & R.A. Jones, 1982. Electrophoretic variation as a tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties of *Brassica oleracea*. Euphytica 31: 417-428.
- Austin S., E. Lojowska, M.K. Ehlenfeldt, A. Kelman & J.P. Helgeson, 1988. Fertile interspecific somatic hybrids of *Solanum*: a novel source of resistance to *Erwinia* soft rot. Phytopathology 78: 1216-1220.
- Bajaj Y.P.S. 1983. *In vitro* production of haploids. p. 228-287. In: Evans D.A., W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada (eds). Handbook of plant cell culture. vol.1. Macmillan Publishing, New York.
- Barsby T.L., P.V. Chuong, S.A. Yarrow, Sau-Ching, M. Coumans, R.J. Kemble, A.D. Powell, W.D. Beversdorf & K.P. Pauls, 1987. The combination of Polima cms and cytoplasmic triazine resistance in *Brassica napus*. Theor. Appl. Genet. 73: 809-814.
- Bates G.W., 1992. Electrofusion of plant protoplasts and the production of somatic hybrids. p.249-264. In: Chang D.C., B.M. Chassy, J.A. Saunders & A.E. Sowers. (eds). Guide to electroporation and electrofusion. Academic Press, San Diego.
- Belliard G., G. Pelletier, F. Vedel & F. Quetier, 1978. Morphological characteristics and chloroplast DNA distribution in different cytoplasmic parasexual hybrids of *Nicotiana tabacum*. Molec. Gen. Genet. 165: 231-237.
- Belliard G., F. Vedel & G. Pelletier, 1979. Mitochondrial recombination in cytoplasmic hybrids of *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion. Nature 281: 401-403.
- Berry S.F., D.Y. Lu, D. Pental & C. Cocking, 1982. Regeneration of plants from protoplasts of *Lactuca sativa* L.. Z. Pflanzenphysiol. 108: 31-38.
- Boeshore M.L., I. Lifshitz, M.R. Hanson & S. Izhar, 1983. Novel composition of mitochondrial genomes in *Petunia* somatic hybrids derived from cytoplasmic male sterile and fertile plants. Molec. Gen. Genet. 190: 459-467.
- Bonnema A.B. & M.A. O'Connell, 1992. Molecular analysis of the nuclear organellar genotype of somatic hybrid plants between tomato (*Lycopersicon esculentum*) and

- Lycopersicon chilense*. Plant Cell Rep. 10: 629-632.
- Borisjuk N.V., V.P. Momat & Gleba, 1988. Novel class of rDNA repeat units in somatic hybrids between *Nicotiana* and *Atropa*. Theor. Appl. Genet. 76: 108-112.
- Boyes C.J., F.J. Zapata & K.C. Sink, 1980. Isolation, culture and regeneration to plants of callus protoplasts of *Salpiglossis sinuata* L.. Z. Pflanzenphysiol. 99: 471-474.
- Brown C., J.A. Lucas & J.B. Power, 1987. Plant regeneration from protoplasts of a wild lettuce species (*Lactuca saligna* L.). Plant Cell Rep. 6: 180-182.
- Buczacki S.T., H. Toxopeus, P. Mattusch, T.D. Johnston, G.R. Dixon & L.A. Hobolth, 1975. Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach. Trans. Br. mycol. Soc. 65(2): 295-303.
- Cardi T., F.D'Ambrosio, D. Consoil, K.J. Puit & K.S. Ramulu, 1993. Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants. Theor. Appl. Genet. 87: 193-200.
- Carlson P.S., H.H. Smith & R.D. Dearing, 1972. Parasexual interspecific plant hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2292-2294.
- Chen Y., 1986. Anther and pollen culture of rice. p. 3-25. In: Han H. & Y. Hongyuan (eds). Haploids of higher plants *in vitro*. China Academic Publishers, Beijing.
- Chetrit P., C. Mathieu, F. Vedel, G. Pelletier & C. Primard, 1985. Mitochondrial DNA polymorphism induced by protoplast fusion in *Cruciferae*. Theor. Appl. Genet. 69: 361-366.
- Chiang M.S., S. Frechette, C.G. Kuo, C. Chong & S.J. Delafield, 1985. Embryogenesis and haploid plant production from anther culture of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). Can. J. Plant Sci. 65: 1033-1037.
- Chu C.C., 1981. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. p.43-50. In: Proceedings of symposium on plant tissue culture. Pitman publishing, London.
- Chu C.C., 1982. Haploids in plant improvement. p.3-25. In: Vasil I.K., W.R. Sowercroft & K.J. Frey (eds). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic press, New York.
- Chuong P.V. & W.D. Beversdorf, 1985. High frequency embryogenesis through isolated microspore culture in *Brassica napus* L. and *B. carinata* Braun. Plant Sci. 39: 219-226.
- Chupeau M.C., C. Bellini, P. Guerche, B. Maisonneuve, G. Vastra & Y. Chupeau, 1989. Transgenic plants of lettuce (*Lactuca sativa*) obtained through electroporation of protoplasts. Biotechnology 7: 503-507.
- Chupeau M.C., B. Maisonneuve, Y. Bellec & Y. Chupeau, 1994. A *Lactuca* universal

- hybridizer, and its use in creation of fertile interspecific somatic hybrids. *Molec. Gen. Genet.* 245: 139-145.
- Chyi Y.S., M.E. Hoenecke & J.L. Sernyk, 1992. A genetic linkage map of restriction fragment length polymorphism loci for *Brassica rapa* (syn. *campestris*). *Genome* 35: 746-757.
- Crute I.R., A.R. Gray, P. Crisp & S.T. Buczacki, 1980. Variation in *Plasmodiophora brassicae* and resistance to clubroot disease in *Brassicaceae* and allied crops - a critical review. *Plant Breed. Abstr.* 50: 91-104.
- Derks F.H.M., J. Wijbrandi, M. Koornneef & C.M. Colijn-Hooymans, 1991. Organelle analysis of symmetric and asymmetric hybrids between *Lycopersicon peruvianum* and *Lycopersicon esculentum*. *Theor. Appl. Genet.* 81: 199-204.
- Benink, A.H., R. Groenwold & F.L. Dieleman, 1982. Resistance of lettuce (*Lactuca*) to the leaf aphid *Nasonovia ribis nigri*. 1. Transfer of resistance from *L. virosa* to *L. sativa* by interspecific crosses and selection of resistant breeding lines. *Euphytica* 31: 291-300.
- 遠藤徹. 1977. アイソザイム. p. 251-189. 木原均監修, 林孝三編集. 植物遺伝学 II 核酸と生合成産物. 裳華房, 東京.
- Engler D.A. & R.G. Grogan, 1982. Isolation, culture and regeneration of lettuce leaf mesophyll protoplasts. *Plant Sci. Lett.* 28: 223-229.
- Engvild K.C., I. Linde-Laursen & A. Lundqvist, 1972. Anther culture of *Datura innoxia*: flower bud stage and embryoid level of ploidy. *Hereditas* 72: 331-332.
- Engvild K.C., 1974. Plantlet ploidy and flower-bud size in tobacco anther cultures. *Hereditas* 76: 320-322.
- Evans D.A. & J.E. Bravo, 1983. Protoplast isolation and culture. p.124-176. In: Evans D.A., W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada (eds). *Handbook of plant cell culture*. Macmillan, New York.
- Fahleson J., L. Rahlen & K. Glimelius, 1988. Analysis of plants regenerated from protoplast fusions between *Brassica napus* and *Eruca sativa*. *Theor. Appl. Genet.* 76: 507-512.
- Fan Z., K.C. Armstrong & W.A. Keller, 1988. Development of microspores *in vivo* and *in vitro* in *Brassica napus* L.. *Protoplasma* 147: 191-199.
- Ferreira M.E., P.H. Williams & T.C. Osborn, 1994. RFLP mapping of *Brassica napus* using doubled haploid lines. *Theor. Appl. Genet.* 89: 615-621.
- Figdore S.S., W.C. Kennard, K.M. Song, M.K. Slocum & T.C. Osborn, 1988. Assessment of the degree of restriction fragment length polymorphism in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 75: 833-840.

- Figdore S.S., M.E. Ferreira, M.K. Slocum & P.H. Williams, 1993. Association of RFLP markers with trait loci affecting clubroot resistance and morphological characters in *Brassica oleracea* L.. *Euphytica* 69: 33-44.
- Fish N., A. Carp & M.G.K. Jones, 1988. Production of somatic hybrids by electrofusion in *Solanum*. *Theor. Appl. Genet.* 76: 260-266.
- Frearson E.M., J.B. Power & E.C. Cocking, 1973. The isolation, culture and regeneration of *Petunia* leaf protoplasts. *Dev. Biol.* 33: 130-137.
- フライフェルダー. 1989. 分子生物学の基礎 (川喜田正夫 訳) p. 320-341. 東京化学同人, 東京.
- Galun E., P. Arzee-Gonen, R. Fluhr, M. Edelman & D. Aviv, 1981. Cytoplasmic hybridization in *Nicotiana*: mitochondrial DNA analysis in progenies resulting from fusion between protoplasts having different organelle constitutions. *Mol. Gen. Genet.* 186: 50-56.
- Gamborg O.L., R.A. Miller & K. Ojima, 1968. Plant cell cultures. I. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151-158.
- Gamborg O.L. & J.P. Shyluk, 1981. Nutrition, media and characteristics of plant cell and tissue cultures. p.21-44. In: Thorpe T.A. (ed). *Plant tissue culture*. Academic press, New York.
- Gaynor J.J., 1986. Electrofusion of plant protoplasts. p.149-171. In: Evans D.A., W.R. Sharp & P.V. Ammirato (eds). *Handbook of plant cell culture*, vol.4. Macmillan, New York,
- George L. & P.S. Rao, 1982. In vitro induction of pollen embryos and plantlets in *Brassica juncea* through anther culture. *Plant Sci. Lett.* 26: 111-116.
- Gleba Y.Y. & K.M. Sytnik, 1984. Methods of screening for parasexual hybrids. p.41-50. In: Shoeman R.L. (ed). *Protoplast fusion. Genetic engineering in higher plants*. Springer-Verlag, Berlin.
- Grandclement C. & G. Thomas, 1996. Detection and analysis of QTLs based on RAPD markers for polygenic resistance to *Plasmodiophora brassicae* Woron in *Brassica oleracea* L. *Theor. Appl. Genet.* 93: 86-90.
- Guha S. & S.C. Maheshwari, 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204: 497.
- Guri A. & K.C. Sink, 1988. Interspecific somatic hybrid plants between eggplant (*Solanum melongena*) and *Solanum torvum*. *Theor. Appl. Genet.* 76: 490-496.
- Hamaoka Y., Y. Fujita & S. Iwai, 1991. Number of chloroplasts in haploids and diploids produced via anther culture in *Brassica campestris*. *Plant Tissue Cult. Lett.* 8: 67-72.

- 林純一. 1987. 細胞融合を利用した高等動物ミトコンドリアゲノムの遺伝学的研究 細胞工学 6: 810-817.
- Heberle-Bors E., 1985. In vitro haploid formation from pollen: a critical review. Theor. Appl. Genet. 71: 361-374.
- Helentjaris, T., D. Weber & S. Wright, 1988. Identification of the genomic locations of duplicate nucleotide sequences in maize by analysis of restriction fragment length polymorphisms. Genetics 118: 353-363.
- Hibi T., H. Kano, M. Sugiura, T. Kazami & S. Kimura, 1988. High-speed electro-fusion and electro-transfection of plant protoplasts by a continuous flow electro-manipulator. Plant Cell Rep. 7: 153-157.
- Hoffmann F., E. Thomas & G. Wenzel, 1982. Anther culture as a breeding tool in rape. II. Progeny analyses of androgenetic lines and induced mutants from haploid cultures. Theor. Appl. Genet. 61: 225-232.
- Ichikawa H., L. Tannno-Suenaga & J. Imamura, 1987. Selection of *Daucus* cybrids based on metabolic complementation between X-irradiated *D. capillifolius* and iodoacetamide-treated *D. carota* by somatic cell fusion. Theor. Appl. Genet. 74: 746-752.
- Jadari R., D. Sihachakr, L. Rossignol & G. Ducreux, 1992. Transfer of resistance to *Verticillium dahliae* Kleb. from *Solanum torvum* S.W. into potato (*Solanum tuberosum* L.) by protoplast electrofusion. Euphytica 64: 39-47.
- James, R.V. & P.H. Williams, 1980. Clubroot resistance and linkage in *Brassica campestris*. Phytopathology 70: 776-779.
- Kao K.N. & M.R. Michayluk, 1975. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. Planta 126: 105-110.
- Kao K.N., 1977. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean-*Nicotiana glauca*. Mol. Gen. Genet. 150: 225-230.
- Keller W.A., T. Rajhathy & J. Lacapra, 1975. In vitro production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Can. J. Genet. Cytol. 17: 655-666.
- Keller W.A. & K.C. Armstrong, 1977. Embryogenesis and plant regeneration in *Brassica napus* anther cultures. Can. J. Bot. 55: 1383-1388.
- Keller W.A. & K.C. Armstrong, 1978. High frequency production of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther cultures. Z. Pflanzenzuchtg 80: 100-108.
- Keller W.A. & K.C. Armstrong, 1979. Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. Theor. Appl. Genet. 55: 65-67.

- Keller W.A. & K.C. Armstrong, 1981. Production of anther-derived dihaploid plants in autotetraploid marrowstem kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). *Can. J. Genet. Cytol.* 23: 259-265.
- Keller W.A. & K.C. Armstrong, 1983. Production of haploids via anther culture in *Brassica oleracea* var. *italica*. *Euphytica* 32: 151-159.
- Keller W.A., K.C. Armstrong & A.I. de la Roche, 1983. The production and utilization of microspore derived haploids in *Brassica* crops. p. 169-183. In: Sen S. K. & K. L. Giles (eds). *Plant cell culture in crop improvement*. Plenum press, New York.
- Kemble R.J. & J.F. Shepard, 1984. Cytoplasmic DNA variation in a potato protoclinal population. *Theor. Appl. Genet.* 69: 211-216.
- Kemble R.J., 1987. A rapid, single leaf, nucleic acid assay for determining the cytoplasmic organelle complement of rapeseed and related *Brassica* species. *Theor. Appl. Genet.* 76: 364-370.
- Kemble R.J., S.A. Yarrow, S.C. Wu & T.L. Barsby, 1988. Absence of mitochondrial and chloroplast DNA recombinations in *Brassica napus* plants regenerated from protoplasts, protoplast fusion and anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 75: 875-881.
- Kennard W.C., K. Poetter, A. Dijkhuizen, V. Meglic, J.E. Staub & M.J. Havey, 1994. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber. *Theor. Appl. Genet.* 89: 42-48.
- Kenton A.Y., A.S. Parokonny, Y.Y. Gleba & M.D. Bennett, 1993. Characterization of the *Nicotiana tabacum* L. genome by molecular cytogenetics. *Mol. Gen. Genet.* 240: 159-169.
- Kesseli R.V. & R.W. Michelmore, 1986. Genetic variation and phylogenies detected from isozyme markers in species of *Lactuca*. *J. Heredity* 77: 324-331.
- Kesseli R.V., O. Ochoa & R.W. Michelmore, 1991. Variation at RFLP loci in *Lactuca* spp. and origin of cultivated lettuce (*L. sativa*). *Genome* 34: 430-436.
- Kianian S.F. & C.F. Quiros, 1992. Generation of a *Brassica oleracea* composite RFLP map: linkage arrangements among various populations and evolutionary implications. *Theor. Appl. Genet.* 84: 544-554.
- Klimaszewska K. & W. A. Keller, 1983. The production of haploids from *Brassica hirta* Moench (*Sinapis alba*) anther cultures. *Z. Pflanzenphysiol.* 109: 235-241.
- Koopman W.J.M., J.H. De Jong & I.M. De Vries, 1993. Chromosome banding patterns in lettuce species (*Lactuca* sect. *Lactuca*, *Compositae*). *Plant. Syst. Evol.* 185: 249-257.
- Kosambi D.D., 1944. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.* 12: 172-175.
- Kubo, T., T. Kumashiro & Y. Saito, 1988. Cytoplasmic male sterile lines of a tobacco variety, Tsukuba 1, developed by asymmetric protoplast fusion. *Jpn. J. Breed.* 38:

- Lander E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln & L. Newburg, 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Landry B.S., R.V. Kesseli, H. Leung & R.W. Michelmore, 1987a. Comparison of restriction endonucleases and sources of probes for their efficiency in detecting restriction fragment length polymorphisms in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 74: 646-653.
- Landry B.S., R.V. Kesseli, B. Farrara & R.W. Michelmore, 1987b. A genetic map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with restriction fragment length polymorphism, isozyme, disease resistance and morphological markers. *Genetics* 116: 331-337.
- Landry B.S., N. Hubert, T. Etoh, J.J. Harada & S.E. Lincoln, 1991. A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragment length polymorphisms detected with expressed DNA sequences. *Genome* 34: 543-552.
- Landry B.S., N. Hubert, R. Crete, M.S. Chang, S.E. Lincoln & T. Etoh, 1992. A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmidiophora brassicae* (Woronin). *Genome* 35: 409-420.
- Lebeda A., 1985. Differences in resistance of wild *Lactuca* species to natural infection of lettuce powdery mildew (*Erysiphe cichoracearum*). *Euphytica* 34: 521-523.
- Leitch I.J. & J.S. Heslop-Harrison, 1992. Physical mapping of the 18S-5.8S-26S rRNA genes in barley by *in situ* hybridization. *Genome* 35: 1013-1018.
- Lichter R., 1981. Anther culture of *Brassica napus* in a liquid culture medium. *Z. Pflanzenphysiol.* 103: 229-237.
- Lichter R., 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenphysiol.* 105: 427-434.
- Lichter R., 1989. Efficient yield of embryoids by culture of isolated microspores of different *Brassicaceae* species. *Plant Breeding* 103: 119-123.
- Lindqvist K., 1960a. Cytogenetic studies in the *serriola* group of *Lactuca*. *Hereditas* 46: 75-151.
- Lindqvist K., 1960b. On the origin of cultivated lettuce. *Hereditas* 46: 319-350.
- Lindqvist K., 1960c. Inheritance studies in lettuce. *Hereditas* 46: 387-470.
- Linsmaier E. M. & F. Skoog, 1965. Organic growth factor requirement of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 18: 100-127.
- Loh C. S. & D. S. Ingram, 1982. Production of haploid plants from anther cultures and secondary embryoids of winter oilseedrape, *Brassica napus* ssp. *oleifera*. *New phytol.*

91: 507-516.

- Maisonneuve B., M.C. Chupeau, Y. Bellec & Y. Chupeau, 1995. Sexual and somatic hybridization in the genus *Lactuca*. *Euphytica* 85: 281-285.
- Matsumoto E., M. Fujimori & F. Otani, 1989. Production of haploid plants via microspore embryogenesis in Chinese cabbage anther culture. *Bull. Nagano Veg., Ornam. Exp. Stn.* 5: 9-14.
- Matsumoto E., 1991. Interspecific somatic hybridization between lettuce (*Lactuca sativa*) and wild species *L. virosa*. *Plant Cell Rep.* 9: 531-534.
- Matthews B.F. & J.M. Widholm, 1985. Organelle DNA compositions and isoenzyme expression in an interspecific somatic hybrid of *Daucus*. *Molec. Gen. Genet.* 198: 371-376.
- McComb J.A., 1978. Variation in ploidy levels of plants derived from anther culture. p.167-180. In: *Proceedings of symposium on plant tissue culture*. Science press, Peking.
- McCouch S.R., G. Kochert, Z.H. Yu, Z.Y. Wang, G.S. Khush, W.R. Coffman & S.D. Tanksley, 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76: 815-829.
- McGrath J.M. & C.F. Quiros, 1991. Inheritance of isozyme and RFLP markers in *Brassica campestris* and comparison with *B. oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 82: 668-673.
- Medgyesy P., L. Menczel & P. Maliga, 1980. The use of cytoplasmic streptomycin resistance: Chloroplast transfer from *Nicotiana tabacum* into *Nicotiana glauca*, and isolation of their somatic hybrids. *Mol. Gen. Genet.* 179: 693-698.
- Medgyesy P., E. Fejes & P. Maliga, 1985. Interspecific chloroplast recombination in a *Nicotiana* somatic hybrid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6960-6964.
- Mehrle W., B. Naton & R. Hampf, 1990. Determination of physical membrane properties of plant cell protoplasts via the electrofusion technique: Prediction of optimal fusion yields and protoplast viability. *Plant Cell Rep.* 8: 687-691.
- Michelmore R.W. & J.A. Eash, 1986. Lettuce. p.512-551. In: Evans D.A., W.R. Sharp & P.V. Ammirato (eds). *Handbook of plant cell culture*, vol.4. Macmillan, New York.
- Michelmore R., E. Marsh, S. Seely & B. Landry, 1987. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 6: 439-442.
- Michelmore R.W., R.V. Kesseli, S.H. Hulbert, E.J. Legg & I. Paran, 1989. Analysis of lettuce downy mildew using molecular markers. p. 45-50. In: Helentjaris T. & B. Burr (eds). *Current communications in molecular biology: Development and application of molecular markers to problems in plant genetics*. Cold Spring Harbor, New York.
- Miller J.C. & S.D. Tanksley, 1990. Effect of different restriction enzymes, probe source, and probe length on detecting restriction fragment length polymorphism in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 80: 385-389.

- 湊莞爾・蔭山節雄・福嶋雅明. 1988. 球内橙黄色の新型ハクサイ T608 号の育成経過及び特性. 園学要旨. 昭 63 春; 176-177.
- Morel G.M. & C. Martin, 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie á virus. C. R. Acad. Sci. 236: 1324-1325.
- Morel G.M., 1965. Clonal propagation of orchids by meristem culture. *Cymbidium Soc. News* 20: 3-11.
- Mukai Y., T.R. Endo & B.S. Gill, 1991. Physical mapping of the 18S.26S rRNA multigene family in common wheat: Identification of a new locus. *Chromosoma* 100: 71-78.
- Murashige T. & F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Murray M. & W.F. Thompson, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acid. Res.* 8: 4321-4325.
- 中島哲夫. 1979. 純系の育成. p.258-268. 新植物組織培養. 朝倉書店, 東京.
- Nea L. & G.W. Bates, 1987. Factors affecting protoplast electrofusion efficiency. *Plant Cell Rep.* 6: 337-340.
- Nehls R., 1978. The use of metabolic inhibitors for the selection of fusion products of higher plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 166: 117-118.
- Niizeki M., M. Kihara & K.N. Cai, 1994. Somatic hybridization between birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus* L.) and soybean (*Glycine max* L.). p.132-144. In: Bajaj Y.P.S. (ed). *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 27. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Nishio T., T. Sato, K. Mori & K. Takayanagi, 1988. Simple and efficient protoplast culture procedure of lettuce, *Lactuca sativa*. *Jpn. J. Breed.* 38: 165-171.
- Nitsch J.P. & C. Nitsch, 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- Norwood J.M., I.R. Crute & A. Lebeda, 1981. The location and characteristics of novel sources of resistance to *Bremia lactucae* Regal (downy mildew) in wild *Lactuca* L. species. *Euphytica* 30: 659-668.
- Ockendon D.J., 1985. Anther culture in Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). II. Effect of genotype on embryo yields. *Ann. appl. Biol.* 107: 101-104.
- Ockendon D.J., 1986. Utilization of anther culture in breeding Brussels sprouts. p.265-272. In: *Genetic manipulation in plant breeding*. Walter de Gruyter, Berlin.
- Ockendon D.J. & R.A. Sutherland, 1987. Genetic and non-genetic factors affecting anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemmifera*). *Theor. Appl. Genet.* 74: 566-570.
- Okamura M., 1994. Pomato: potato protoplast system and somatic hybridization between potato and a wild tomato. p. 209-223. In: Bajaj Y.P.S. (ed). *Biotechnology in*

- agriculture and forestry, vol 27. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Olin-Fatih M., C. Lannér & H. Lindgren, 1996. Analysis of chromosome, mtDNA and cpDNA patterns in five somatic hybrids between *Brassica alboglabra* Bailey and *Brassica campestris* L.. *Euphytica* 90: 281-288.
- Pearce R.S. & E.C. Cocking, 1973. Behaviour in culture of isolated protoplasts from "Paul's Scarlet" rose suspension culture cells. *Protoplasma* 77: 165-180.
- Pehu E., A. Karp, K. Moore, S. Steele, R. Dunkley & M.G.K. Jones, 1989. Molecular, cytogenetic and morphological characterization of somatic hybrids of dihaploid *Solanum tuberosum* and diploid *S. brevidens*. *Theor. Appl. Genet.* 78: 696-704.
- Perl A., D. Aviv & E. Galun, 1990. Protoplast-fusion-derived *Solanum* cybrids: application and phylogenetic limitations. *Theor. Appl. Genet.* 79: 632-640.
- Phippen C. & D.J. Ockendon, 1990. Genotype, plant, bud size and media factors affecting anther culture of cauliflowers (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). *Theor. Appl. Genet.* 79:33-38.
- Polsoni L., L.S. Kott & W.D. Beversdorf, 1988. Large-scale microspore culture technique for mutation-selection studies in *Brassica napus*. *Can. J. Bot.* 66: 1681-1685.
- Provvidenti R., R.W. Robinson & J.W. Shail, 1980. A source of resistance to a strain of cucumber mosaic virus in *Lactuca saligna* L.. *HortScience* 15: 528-529.
- Puit, K.J., S. Roest & L.P. Pijnacker, 1986. Somatic hybrid potato plants after electrofusion of diploid *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Cell Rep.* 5: 262-265.
- Quiros C.F., H. Jinguo & M.J. Truco, 1994. DNA-based marker maps of *Brassica*. p. 199-222. In: Phillips R.L. & I.K. Vasil (eds). *DNA-based markers in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Randhawa P.S. & E.L. Civerolo, 1985. A detached-leaf bioassay for *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. *Phytopathology* 75: 1060-1063.
- Ratushnyak Y.I., N.N. Cherep & S.A. Latypov, 1994. Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* Dun.. p. 224-243. In: Bajaj Y.P.S. (ed). *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 27. Springer-Verlag, Berlin.
- Reed K.C. & D.A. Mann, 1985. Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucl. Acid. Res.* 13: 7207-7221.
- Robertson D., J.D. Palmer, E.D. Earle & M.A. Mutschler, 1987. Analysis of organelle genomes in a somatic hybrid derived from cytoplasmic male sterile *Brassica oleracea* and atrazine-resistant *B. campestris*. *Theor. Appl. Genet.* 74: 303-309.

- Robinson, R.W., J.D. McCreight & E.J. Ryder, 1983. The genes of lettuce and closely related species. *Plant Breed. Rev.* 1: 267-294.
- Rode A., C. Hartmann, D. Falconet, B. Lejeune, F. Queti  r, A. Benslimane, Y. Henry & J. Buyser, 1987. Extensive mitochondrial DNA variation in somatic tissue cultures initiated from wheat immature embryos. *Curr. Genet.* 12: 369-376.
- Rogers S.O. & A.J. Bendich, 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76.
- Rosen B., C. Hallden & W.K. Heneen, 1988. Diploid *Brassica napus* somatic hybrids: Characterization of nuclear and organellar DNA. *Theor. Appl. Genet.* 76: 197-203.
- Rothenberg M., M.L. Boeshore, M.R. Hanson & S. Izhar, 1985. Intergenomic recombination of mitochondrial genomes in a somatic hybrid plant. *Curr. Genet.* 9: 615-618.
- Roulund N., S.B. Andersen & B. Farestveit, 1991. Optimal concentration of sucrose for head cabbage (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* (L.) Alef.) anther culture. *Euphytica* 52: 125-129.
- Ruesink A.W., 1978. Leucine uptake and incorporation by *Convolvulus* tissue culture cells and protoplasts under severe osmotic stress. *Physiol. Plant* 44: 48-56.
- Ruzin S.E. & S.C. McCarthy, 1986. The effect of chemical facilitators on the frequency of electrofusion of tobacco mesophyll protoplasts. *Plant Cell Rep.* 5: 342-345.
- Ryder E.J. & T.W. Whitaker, 1976. Lettuce. p. 39-41. In: Simmonds N.W. (ed). *Evolution of crop plants*. Longman, London.
- Ryder E.J., 1979. Leafy salad vegetables. p.47-52. AVI, Westport.
- Saghai-Marooof M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen & R.W. Allarad, 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 8014-8018.
- Sato T., T. Nishio & M. Hirai, 1989. Varietal differences in embryogenic ability in anther culture of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*). *Japan. J. Breed.* 39: 149-157.
- 佐藤隆徳・西尾剛・平井正志. 1989. ハクサイ (*Brassica campestris* L.) の小胞子培養における初期培養条件. *野菜・茶試研報* A. 3: 55-65.
- Seaman, W.L., J.C. Walker & R.H. Larson, 1963. A new race of *Plasmodiophora brassicae* affecting Badger Shipper cabbage. *Phytopathology* 53: 1426-1429.
- Sequin-Schwartz G., D.S. Hutcheson & R.K. Downey, 1983. Anther culture studies in *Brassica campestris*. In: *Proc. 6th Int. Rapeseed Conf.*, Paris.
- Sharma K.K. & S. Bhojwani, 1985. Microspore embryogenesis in anther cultures of two Indian cultivars of *Brassica juncea* (L.) Czern. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 4: 235-239.

- Shepard J.F. & R.E. Totten, 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato: Isolation, proliferation, and plant regeneration. *Plant Physiol.* 60: 313-316.
- Shillito R.D., J. Paszkowski & I. Potrykus, 1983. Agarose plating and a bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast-derived colonies in a number of plant species. *Plant Cell Rep.* 2: 244-247.
- 白田昭・大畑貫一・芹沢拙夫・土屋行夫. 1982. *Pseudomonas cichorii* による腐敗病の発病とレタスの生育ステージ・葉位の関係,ならびに感染機構. 農技研報C 36: 61-73.
- Sidorov V.A., L. Menczel, F. Nagy & P. Maliga, 1981. Chloroplast transfer in *Nicotiana* based on metabolic complementation between irradiated and iodoacetate treated protoplasts. *Planta* 152: 341-345.
- Siebel J. & K.P. Pauls, 1989. A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 78: 473-479.
- Sjödín C. & K. Glimelius, 1989. *Brassica naponigra*, a somatic hybrid resistant to *Phoma lingam*. *Theor. Appl. Genet.* 77: 651-656.
- Slocum M.K., S.S. Figdore, W.C. Kennard, J.Y. Suzuki & T.C. Osborn, 1990. Linkage arrangement of restriction fragment length polymorphism loci in *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 80: 57-64.
- Song K.M., J.Y. Suzuki, M.K. Slocum, P.H. Williams & T.C. Osborn, 1991. A linkage map of *Brassica rapa* (syn. *campestris*) based on restriction fragment length polymorphism loci. *Theor. Appl. Genet.* 82: 296-304.
- Sopory S.K., E. Jakobsen & G. Wenzel 1978. Production of monoploid embryoids and plantlets in cultured anthers of *Solanum tuberosum*. *Plant Sci. Lett.* 12: 47-54.
- Sowers A.E., 1992. Mechanisms of electroporation and electrofusion. p.119-138. In: Chang D.C., B.M. Chassy, J.A. Saunders & A.E. Sowers. (eds). Guide to electroporation and electrofusion. Academic Press, San Diego.
- Sundberg E., M. Landgren & K. Glimelius, 1987. Fertility and chromosome stability in *Brassica napus* resynthesised by protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 75: 96-104.
- Sunderland N., G.B. Collins & J.M. Dunwell, 1974. The role of nuclear fusion in pollen embryogenesis of *Datura innoxia* Mill. *Planta* 117: 227-241.
- Takahata Y., D.C.W. Brown & W.A. Keller, 1991. Effect of donor plant age and inflorescence age on microspore culture of *Brassica napus* L.. *Euphytica* 58: 51-55.
- Tempelaar M.J. & M.J.K. Jones, 1985. Fusion characteristics of plant protoplasts in electric fields. *Planta* 165: 205-216.
- Tempelaar M.J., A. Duyst, S.Y. De Vlas, G. Krol, C. Symmonds & M.J.K. Jones, 1987. Modulation and direction of the electrofusion response in plant protoplasts. *Plant*

- Sci. 48: 99-105.
- Terada R., Y. Yamashita, S. Nishibayashi & K. Shimamoto, 1987. Somatic hybrids between *Brassica oleracea* and *B. campestris*: selection by the use of iodoacetamide inactivation and regeneration ability. Theor. Appl. Genet. 73: 379-384.
- Teutonico R.A. & T.C. Osborn, 1994. Mapping of RFLP and qualitative trait loci in *Brassica rapa* and comparison to the linkage maps of *B. napus*, *B. oleracea*, and *Arabidopsis thaliana*. Theor. Appl. Genet. 89: 885-894.
- Thomas E. & G. Wenzel, 1975. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. Z. Pflanzenzuchtg 74: 77-81.
- Thompson, R.C., T.W. Whitaker & W.F. Kosar, 1941. Interspecific genetic relationship in *Lactuca*. J. Agric. Res. 63: 91-107.
- Toxopeus H. & A.M.P. Janssen, 1975. Clubroot resistance in turnip. II. The 'slurry' screening method and clubroot races in the Netherlands. Euphytica 24: 751-755.
- 土屋行夫・大畑貫一・家村浩海・実松孝明・白田昭・藤井溥. 1979. レタスの腐敗をおこす病原細菌の同定. 農技研報C 33: 77-99.
- 塚田元尚・下條周・松本悦夫・藤森基弘. 1987. レタス腐敗性病害抵抗性品種の育種. (第2報) 導入野生種の抵抗性. 園学要旨 昭62秋: 222-223.
- 角田重三郎. 1977. 生殖の制御. p.62-140. 植物育種学. 文永堂. 東京.
- 内宮博文. 1984. 植物体細胞雑種のリボソームRNA遺伝子. 細胞工学 3:528-532.
- 鵜飼保雄・大沢良・斉藤彰・林武司. 1995. DNA多型連鎖地図作成とQTL解析のためのコンピュータ・プログラムMAPL. 育種. 45: 139-142.
- Uzunova M., W. Ecker, K. Weissleder & G. Röbbelen, 1995. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). 1. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. Theor. Appl. Genet. 90: 194-204.
- Vedel F., P. Chetrit, C. Mathieu, G. Pelletier & C. Primard, 1986. Several different mitochondrial DNA regions are involved in intergenomic recombination in *Brassica napus* cybrid plants. Curr. Genet. 11: 17-24.
- Voorrips R.E., M.C. Jongerius & H.J. Kanne, 1997. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. Theor. Appl. Genet. 94: 75-82.
- Wallin A. & R. Savage, 1982. A method for selection of heterokaryons from products of induced plant protoplast fusion. p. 621-622. In: Fujiwara A. (ed). Plant tissue culture; Proceedings of the 5th international congress of plant tissue and cell culture. Maruzen, Tokyo.
- Wang T.B. & M. Niizeki, 1994. Somatic hybridization between *Zea mays* and *Triticum* sect. *trititrigia*. p. 99-111. In: Bajaj Y.P.S. (ed). Biotechnology in agriculture and

- forestry, vol 27. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 渡辺格 (監). 1989. クローニングとシークエンス. P. 34-40. 農村文化社, 東京.
- Wenzel G., F. Hoffmann & E. Thomas, 1977. Anther culture as a breeding tool in rape. I. Ploidy level and phenotype of androgenetic plants. Z. Pflanzenzuchtg 78: 149-155.
- Whitaker T.W., A.N. Kishaba & H.H. Toba, 1974. Host-parasite interrelations of *Lactuca saligna* L. and the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hubner). J. Am. Soc. Hortic. Sci. 99: 74-78.
- Williams P.H., 1966. A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. Phytopathology 56: 624-626
- Wit F., 1964. Inheritance of reaction to clubroot in turnips. Hort. Res. 5: 47-49.
- Yamashita Y., R. Terada, S. Nishibayashi & K. Shimamoto, 1989. Asymmetric somatic hybrids of *Brassica*: partial transfer of *B. campestris* genome into *B. oleracea* by cell fusion. Theor. Appl. Genet. 77: 189-194.
- 米澤勝衛. 1985. シュミレーションによる半数体育種法の効率評価. 育学雑 (別2) 35: 360-363.
- 吉川宏昭・芦澤正和・飛騨健一. 1981. アブラナ科野菜の根こぶ病抵抗性育種に関する研究. III 根こぶ病抵抗性の早期検定法. 野菜試報. A. 8: 1-21.
- 吉川宏昭. 1991. CR系品種を侵すハクサイ根こぶ病菌の発生. 今月の農業 7月号: 110-113.
- 吉川宏昭. 1993. アブラナ科野菜の根こぶ病抵抗性育種に関する研究. 野菜・茶試報. A. 7: 1-165.
- Zohary D., 1991. The wild genetic resources of cultivated lettuce (*Lactuca sativa* L.). Euphytica 53: 31-35.

付 録

1. CTAB 法による緑葉からのゲノム DNA 抽出

ガラス温室内で育成した植物体の若い葉約 5 g を採取し、細断後、液体窒素で凍結して乳鉢で粉末状になるまで磨砕した。磨砕した試料は直ちに約 70°C に暖めたビーカー内の 5 ml の 2 × CTAB 液 (2% CTAB、0.1M Tris-HCl pH8.0、1.4M NaCl、1% PVP) に入れて混合し、50ml チューブに移して 55°C の水槽内で 10 分間保温した。その後、等容のクロロホルム/イソアミルアルコール (24/1) を加えて 30 分緩やかに振とうした後、2800rpm で 15 分間遠心分離した。上層 (水相) を別のチューブに移して等容のクロロホルム/イソアミルアルコールを加えて 10 分間振とうし、先と同様な遠心分離操作を行った。水相を新たなチューブに移し、1/10 容の 10% CTAB 液 (10% CTAB、0.7M NaCl) を加えて軽く転倒混和した。さらに等容の沈殿バッファー (1% CTAB、5mM Tris-HCl pH8.0、10mM EDTA) を加えて転倒混和し、30 分間静置した後、2800rpm で 15 分間遠心分離した。生じた沈殿を 55°C で 5 ml の 1M NaCl-TE (1M NaCl、10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA) に完全に溶かしてから、等容のイソプロパノールを加え、混和後、2800rpm で 10 分間遠心分離した。上清を除去して沈殿物を 5 ml の 70% エタノールで洗浄し、遠心分離 (2800rpm、10 分) により再度チューブ底に沈殿を集めた。上清のエタノールを除いて風乾した沈殿は、55°C で適量の TE バッファー (10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA) に溶解し、30 分間 1/10 容の 10 μg/ml RNase による処理を行った後、DNA 試料として分析に供した。

2. mRNA の調製と cDNA の合成

ハクサイ HM3-3 系統の 1 個体の外葉展開期の根部組織 10g を供試し、塩化セシウムによる超遠心分離を組合せたフェノール-SDS 法に従って全 RNA を抽出した。エタノール沈殿した RNA を 600 μl の溶出バッファー (10mM Tris-HCl pH7.5、5mM EDTA) に溶解して、1/20 容の 10% SDS を混合し、65°C で 5 分間処理した後、急冷した。室温に戻してから等量の結合バッファー (10mM Tris-HCl pH7.5、5mM EDTA、1M NaCl、0.5% SDS) を加え、オリゴ (dT) セルロース (Type 7、Pharmacia 社) カラムを通してポリ (A)⁺RNA をオリゴ (dT) セルロースに吸着させた。その後溶出バッファーでポリ (A)⁺RNA を溶出して回収し、得られたポリ (A)⁺RNA (mRNA) 4 μg を cDNA 合成に供した。cDNA の合成手順は市販の cDNA 合成キット (Amersham 社) のマニュアルに従った。

3. DIG システムによるハイブリダイゼーション

プローブの標識、ハイブリダイゼーション、シグナルの検出は以下のような手順で行った。

- ① プローブの標識: PCR で増幅した cDNA クローン 1 μg (/15 μl) を沸騰水中で 10 分間加

熱して、氷中で急冷し、1本鎖に変性させた。ヘキサヌクレオチドミックス、dNTPミックス各2 μ lを混合し、全量が19 μ lとなるように滅菌水で調製した後、1 μ lのKlenow酵素を加え、37°Cに保温して標識反応を進めた。20時間後、2 μ lの0.2M EDTA・pH8.0を加えて反応を停止し、さらに2.5 μ lの4 M LiClと75 μ lの冷エタノールを加えて-20°Cに2時間置いた。12000g・15分の遠心分離により生じたプローブ沈殿は70%エタノールで洗浄後、真空乾燥し、40 μ lのTEバッファーに溶解した。②ハイブリダイゼーション：プロットティングフィルター(130cm²×3枚)をプラスチックバッグに入れ、ハイブリダイゼーションバッファー(50% フォルムアミド、5×SSC、0.1% N-Lauroyl sarcosine、0.02% SDS、2% ブロッキング試薬)30mlを加えてシールし、42°Cで5時間プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーション後、バッファーを捨てて、10時間の加熱、急冷で1本鎖に変性した10mlのプローブ液(ハイブリダイゼーションバッファーで標識DNA濃度を約50ng/mlに調製)を加え、42°Cで16時間インキュベートした。ハイブリダイゼーションフィルターは室温下200mlの2×SSC+0.1% SDS溶液で5分間2回洗浄し、さらに200mlの0.1×SSC+0.1% SDS溶液に移して68°Cで15分間2回洗浄した。③ハイブリダイゼーションシグナルの検出：ハイブリダイゼーション処理を終えたフィルターは150mlの洗浄バッファー(バッファー1…0.1M マレイン酸、0.15M NaCl、pH7.5…中に0.3% Tween-20を含む)で5分間洗浄した後、100mlのバッファー2(バッファー1中に1% ブロッキング試薬を含む)に移して30分間インキュベートし、さらに80mlの標識抗体液(抗ジゴキシゲニン Ap, Fabフラグメントをバッファー2で75mU/mlに調製)中で30分間処理した。抗体処理フィルターは洗浄バッファー400mlで15分間2回の洗浄を行って非結合抗体を除去した後、80mlのバッファー3(0.1M Tris-HCl、0.1M NaCl、50mM MgCl₂、pH9.5)に浸けて5分間平衡化し、CSPD (Disodium 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan} 4-yl)phenyl phosphate) 基質溶液(バッファー3で0.1mg/mlに調製)80ml中で5分間処理した。処理が終了したフィルターはラッピングフィルムに包み、37°Cで15分間プレインキュベートした後、X線フィルム X-OMAT AR (Kodak 社)に感光した。